ÜBER DIE IN VITRO METABOLISIERUNG VON STEROIDEN DURCH OVARGEWEBE DES LEGEHUHNS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

1968

vorgelegt von

Hans-Peter Anders

aus Trachenberg

Berlin 1967

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

ÜBER DIE IN VITRO METABOLISIERUNG VON STEROIDEN DURCH OVARGEWEBE DES LEGEHUHNS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Peter Anders

aus Trachenberg

Berlin 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Riemschneider

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Manecke

Tag der mündlichen Prüfung: 6.7.1967

Tag der Promotion: 29. Jan. 1968

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. R. R i e m s c h n e i d e r im Institut für Tierzucht und Tierernährung der Freien Universität Berlin und im Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin durchgeführt.

Herrn Professor Dr. K. B r o n s c h bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. R. R i e m s c h n e i d e r und Herrn Dr. Dr. E. G e r h a r d s danke ich für wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Schering AG, Berlin gefördert.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0094

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung und Problemstellung..... 1
2. Anlage der Versuche..... 4
   2.1 Papierchromatographie..... 4
      2.1.1 Allgemeine Methodik..... 4
      2.1.2 Nachweis von Steroidgruppen auf dem Papier. 5
   2.2 Messung der Radioaktivität..... 8
   2.3 Inkubation und Extraktion..... 9
   2.4 Trennung der Metabolite..... 9
      2.4.1 Abtrennung der phenolischen Steroide..... 11
      2.4.2 Trennung in Keto- und Hydroxysteroide..... 11
      2.4.3 Abtrennung der 3ß-Hydroxysteroide..... 12
   2.5 Nachweis einzelner Steroide..... 13
      2.5.1 Acetylierung von primären und sekundären Steroidalkoholen mit Pyridin/Eisessig..... 13
      2.5.2 Methylierung von phenolischen Steroiden... 14
      2.5.3 Oxydation von sekundären Steroidalkoholen mit tertiärem Butylchromat..... 14
      2.5.4 Oxydation von 20ß-Hydroxysteroiden mit 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase und NAD.. 15
      2.5.5 Reduktion von 20-Ketosteroiden mit 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase und NADH..... 15
      2.5.6 Reduktion von 17-Ketosteroiden mit Natriumborhydrid..... 15
      2.5.7 Abspaltung der C_{17}-Seitenkette mit Natriumwismutat..... 16
3. Versuchsdurchführung und Ergebnisse..... 17
   3.1 Radioaktives Material..... 17
   3.2 Gewinnung des Gewebes..... 17
   3.3 Versuche mit 4-^{14}C-Progesteron..... 18
      3.3.1 Trennung der Metabolite..... 18
      3.3.2 Identifizierung der Metabolite..... 23
      3.3.3 Abhängigkeit der Metabolisierungsrate von der Inkubationsdauer..... 29

3.4 Versuche mit 4-^{14}C-Δ^5-Pregnen-3ß-ol-20-on..... 34
3.4.1 Trennung der Metabolite..... 34
3.4.2 Identifizierung der Metabolite..... 37
3.5 Versuche mit 6-^{3}H-Δ^4-Androsten-3,17-dion..... 39
3.6 Versuche mit 6-^{3}H-Testosteron..... 43
4. Diskussion der Ergebnisse..... 46
5. Zusammenfassung..... 50

Literaturhinweise..... 52

1. Einführung und Problemstellung

Die Hauptwege und Regulationsprinzipien der Biosynthese und Metabolisierung von Steroidhormonen beim Säugetier sind bekannt(1)(2). Die Biosynthese der Steroidhormone vollzieht sich in den endokrinen Organen (Nebennierenrinde, Ovar, Placenta, Testes), die mit den entsprechenden Enzymsystemen ausgestattet sind. In Abbildung 1 ist der Ablauf der Steroidbiosynthese im Ovar des Säugetiers dargestellt. (Abbildung 1 s. S.2)

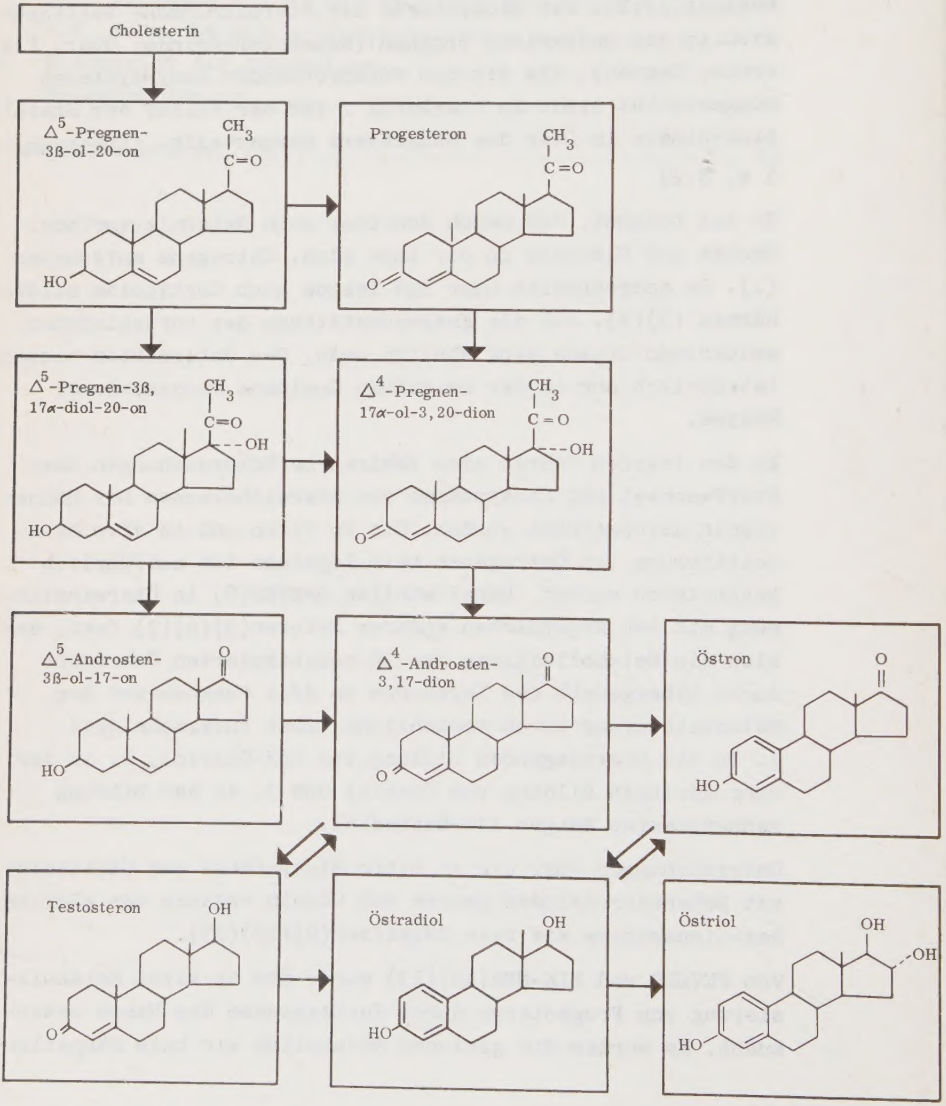
Es ist bekannt, daß neben dem Ovar auch Nebennierenrinde, Testes und Placenta in der Lage sind, Östrogene aufzubauen (1). Da andererseits Ovar und Testes auch Corticoide bilden können (3)(4), muß die Enzymausstattung der verschiedenen endokrinen Organe sehr ähnlich sein. Der Unterschied besteht tatsächlich nur in der relativen Dominanz verschiedener Enzyme.

In den letzten Jahren sind zahlreiche Untersuchungen über Stoffwechsel und Biosynthese von Steroidhormonen bei Hühnervögeln durchgeführt worden. Die in vitro und in vivo Metabolisierung von Östrogenen beim Legehuhn ist ausführlich beschrieben worden. Dabei stellte BREUER(8) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren(5)(6)(7) fest, daß sich die Metabolisierung der 16-substituierten Östrogene durch Lebergewebe des Legehuhns in drei Punkten von der Metabolisierung durch menschliche Leber unterscheidet: 1. In der überwiegenden Bildung von 16β-Östriol, 2. in der sehr geringen Bildung von Östriol und 3. in der Bildung nennenswerter Mengen 17α-Östradiol.

Untersuchungen über die in vitro Biosynthese der Corticoide mit Nebennierenrinden-gewebe von Vögeln ergaben das gleiche Reaktionsschema wie beim Säugetier(9)(10)(11).

Von FEVOLD und EIK-NES(12)(13) wurde die in vitro Metabolisierung von Progesteron durch Testesgewebe des Hahns untersucht. Es wurden die gleichen Metabolite wie beim Säugetier

Abbildung 1: HAUPTWEGE DER STEROIDBIOSYNTHESE IM OVAR DES SÄUGETIERS.



nachgewiesen. Der einzige Unterschied bestand in einer höheren 20β- und 20α-Hydroxysteroid-dehydrogenaseaktivität.

Über die Steroidbiosynthese im Ovar des Legehuhns ist bisher wenig bekannt. Berichtet wurde lediglich über den Nachweis von Progesteron (14), Östron, Östradiol und Östriol(15) in Ovargewebe und über die histochemische Identifizierung zweier steroidspezifischer Enzyme (Δ^5-3β-Hydroxysteroid-dehydrogenase und 17β-Hydroxysteroid-dehydrogenase)(16).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche Zwischen- und Endprodukte bei der Metabolisierung von radioaktiv markierten Steroidhormonen durch Gewebe des Legehuhnovars in vitro entstehen.
Als Steroide sollten 4-^{14}C-Progesteron, 4-^{14}C-Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on, 6-^{3}H-Δ^4-Androsten-3,17-dion und 6-^{3}H-Testosteron eingesetzt werden. Die radioaktiv markierten Metabolite sollten identifiziert werden. Aus der Art der Metabolite sollten Schlußfolgerungen auf das Enzymspektrum des Legehuhnovars gezogen werden. Die quantitative Verteilung der Metabolite in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer sollte festgestellt werden, um daraus Rückschlüsse auf die Reihenfolge der einzelnen enzymatischen Reaktionen ziehen zu können.
Ein Biosynthese- bzw. Metabolisierungsschema sollte aufgestellt werden zum Vergleich mit dem entsprechenden Schema vom Säugetier.

2. Anlage der Versuche

Die radioaktiv markierten Steroide wurden mit Ovargewebe inkubiert. Die dabei erhaltenen Metabolite wurden aufgrund ihres unterschiedlichen chromatographischen und chemischen Verhaltens getrennt und identifiziert.

2.1 Papierchromatographie

2.1.1 Allgemeine Methodik

Es wurde mit Lösungsmittelsystemen vom Zaffaroni-Typ(17) gearbeitet. Die mobile Phase (n-Hexan, Benzol, Chloroform, Cyclohexan oder Toluol) wurde durch einstündiges Schütteln mit der stationären Phase (Formamid, Dimethylformamid oder Propylenglykol) gesättigt. Die Papierstreifen (Whatman No.1; 4 cm x 55 cm) wurden mit der stationären Phase imprägniert. Dies geschah durch kurzes Eintauchen der Streifen in das Imprägnierungsmittel. Formamid und Propylenglykol wurden zum Imprägnieren im Verhältnis 1:1 mit Methanol verdünnt. Dimethylformamid wurde unverdünnt benutzt. Die feuchten Streifen wurden zwischen Filterpapier abgelöscht.

Die in Spitzgläsern eingeengten Proben wurden in 3 x 5 Tropfen eines Äther-Chloroformgemisches (3 : 1) gelöst und auf die imprägnierten Streifen aufgetragen. 30 Min. nach dem Imprägnieren wurden die Streifen in den mit Lösungsmitteldampf gesättigten Tank gebracht und nach einstündiger Equilibrierungszeit mit der mobilen Phase entwickelt. Es wurde absteigend chromatographiert. Nach Ende der Chromatographie wurden die Streifen 1 Stunde bei 40° C getrocknet.

Die Steroide wurden vom Papier mit Methanol eluiert. Die ausgeschnittenen Papierstücke wurden an eine an der Spitze umgebogene Kanüle einer 20 ml-Injektionsspritze gehängt. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 20-30 Tropfen pro Minute konnten so mit 20 ml Methanol bis zu 200 µg Steroid quantitativ eluiert werden.

2.1.2 Nachweis von Steroidgruppen auf dem Papier

Als erster Hinweis auf die Identität der einzelnen Metabolite diente der Vergleich der R_f- und R_s-Werte der Metabolite in verschiedenen Chromatographiesystemen mit den entsprechenden Werten von authentischen Referenzsubstanzen. Für die Systeme, die nur bis zum Ende des Streifens entwikkelt wurden, sind in Tabelle 1 die R_f-Werte der Vergleichssubstanzen angegeben. (Tabelle 1 s. S.6)

Der R_f-Wert ist folgendermaßen definiert:

$$R_f\text{-Wert} = \frac{\text{Distanz Start-Steroid}}{\text{Distanz Start-Lösungsmittelfront}}$$

Für die Systeme, mit denen durchlaufend chromatographiert wurde, sind in Tabelle 2 die R_s-Werte der Referenzsubstanzen angegeben.

Der R_s-Wert ist folgendermaßen definiert:

$$R_s\text{-Wert} = \frac{\text{Distanz Start-Steroid}}{\text{Distanz Start-Bezugssubstanz}}$$

Als Bezugssubstanz wurde Testosteron gewählt.

Die Lokalisierung der Referenzsubstanzen auf den Papierstreifen wurde je nach Charakter der Verbindung mit einer der folgenden Methoden durchgeführt.

a. UV-Kontaktphotographie zum Nachweis der Δ^4-3-Ketosteroide (18)

Δ^4-3-Ketosteroide absorbieren UV-Licht bei etwa 240 nm. Zur Anfertigung einer UV-Kontaktphotographie wurde der getrocknete Chromatographiestreifen über AGFA-COPEX-C-Papier gespannt und 3 Sekunden mit einer UV-Lampe belichtet. Nach Entwicklung und Fixierung wurden die UV-absorbierenden Steroide als weiße Banden auf schwarzem Grund sichtbar.

Tab.1: R_f-Werte von Steroiden in verschiedenen Chromatographiesystemen

Steroide	Systeme und Laufzeit				
	F/Hx 3 h	DMF/Cy 5 h	F/Be 3 h	F/Chl 3 h	P/Tol 5 h
Progesteron	0.29	-	-	-	0.95
5β-Pregnan-3α-ol-20-on	0.37	-	-	-	0.53
5β-Pregnan-3α-ol-20-on-acetat	0.90	-	-	-	-
5β-Pregnan-3α,20β-diol	0.18	-	0.72	-	0.21
5β-Pregnan-3α,20β-diol-diacetat	1.00	-	-	-	-
5β-Pregnan-3,20-dion	0.67	-	-	-	1.00
5α-Pregnan-3,20-dion	0.62	-	-	-	1.00
Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on	0.18	-	-	-	0.56
Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on-acetat	0.73	-	-	-	-
Δ^4-Pregnen-20α-ol-3-on	0.05	-	-	-	0.51
Δ^4-Pregnen-20α-ol-3-on-acetat	0.71	-	-	-	-
Corticosteron	0	-	0.10	-	0.13
Δ^4-Pregnen-6β-ol-3,20-dion	0	-	0.45	-	0.32
Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion (DOC)	0.02	-	0.63	-	0.58
Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion	0.02	-	-	-	0.49
Δ^4-Androsten-3,17-dion	0.06	-	-	-	0.80
Testosteron	0.02	-	-	-	0.35
Testosteron-acetat	0.70	-	-	-	-
Östron	-	0.01	0.56	0.95	-
Östron-3-methyläther	-	0.61	-	-	-
Östradiol	-	0	0.19	0.50	-
Östradiol-3-methyläther	-	0.38	-	-	-
Östriol	-	0	0.01	0.02	-
Östriol-3-methyläther	-	0.02	-	-	-
Δ5-Pregnen-3β-ol-20-on	0.16	-	-	-	0.58
Δ5-Pregnen-3β,17α-diol-20-on	0	-	0.50	-	0.09
Δ5-Androsten-3β-ol-17-on	0.08	-	0.73	-	0.49

F/Hx Formamid/n-Hexan
DMF/Cy Dimethylformamid/Cyclohexan
F/Be Formamid/Benzol
F/Chl Formamid/Chloroform
P/Tol Propylenglykol/Toluol

b. Zimmermann-Reaktion zum Nachweis von Ketosteroiden(19)

Die Streifen wurden durch eine frischbereitete Mischung aus 4 Teilen 1 % m-Dinitrobenzol in Äthanol und 1 Teil 10 n KOH gezogen, mit Filterpapier abgelöscht und auf 75 °C erwärmt. 3-, 17- und 20-Ketosteroide erschienen als rot-violette oder rot-braune Flecken.

c. Phosphormolybdänsäure-Reaktion zum Nachweis von Hydroxysteroiden(20)

Die Streifen wurden mit einer 10 %igen Lösung von Phosphormolybdänsäure in Äthanol besprüht und bei 90 °C getrocknet. Die Hydroxysteroide erschienen als dunkelblaue Flecken.

Tabelle 2: R_s-Werte von Steroiden in verschiedenen Chromatographiesystemen (s = Testosteron)

Steroide	Systeme und Laufzeit F/Hx 45 h	DMF/Cy 15 h
Corticosteron	0.01	-
Δ^4-Pregnen-6β-ol-3,20-dion	0.13	-
Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion (DOC)	0.60	-
Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion	0.60	-
Δ^4-Androsten-3,17-dion	-	1.9
Testosteron	1.00	1.0
5β-Androstan-3α-ol-17-on	-	1.8
5α-Androstan-3α-ol-17-on	-	2.3
5β-Androstan-3,17-dion	-	3.6
5α-Androstan-3,17-dion	-	3.6
5β-Androstan-17β-ol-3-on	-	2.2
5α-Androstan-17β-ol-3-on	-	2.15
5β-Androstan-3α,17β-diol	-	0.7
5α-Androstan-3α,17β-diol	-	0.9

F/Hx Formamid/n-Hexan
DMF/Cy Dimethylformamid/Cyclohexan

2.2 Messung der Radioaktivität

Die Verteilung der ^{14}C- und ^{3}H-Aktivität auf den Papierstreifen wurde mit dem Radiochromatographen FH 452 (Fa.Frieseke & Höpfner) gemessen. Als Detektor wurde ein Methandurchflußzähler FH 407 verwendet. Die Aktivitätsverteilung wurde mit einem Registriergerät FH 585 mit Potentiometerschreiber aufgezeichnet. Die Hochspannung betrug 3200 V und die Eingangsempfindlichkeit 10 mV. Bei dieser Einstellung ergab sich ein Nulleffekt von 30-50 Impulsen pro Minute. Zur Feststellung der quantitativen Verteilung wurden die Peaks ausgeschnitten und gewogen.

Zur Bestimmung niedriger Aktivitäten, die auf den Papierstreifen mit dem Methandurchflußzähler nicht mehr meßbar waren, gleichfalls zur Messung der Aktivität im wäßrigen Rückstand des Inkubationsansatzes wurde ein Tri-Carb-Spektrometer aus der 3000er Serie (Packard-Instruments Corp., Ill., USA) benutzt. Als flüssiger Szintillator für die Messung der Methanoleluate wurde eine Lösung von 50 mg 1,4-Bis(5-phenyl-oxazolyl-2)-benzol und 4 g Terphenyl (1,4-Diphenylbenzol) in 1000 ml Toluol verwendet. Es wurden 5 ml Methylalkohol in 15 ml Szintillatortoluol zur Messung gebracht. Als wasserlöslicher Szintillator zur Messung der Restwasserphase wurde eine Lösung von 100 g Naphthalin, 10 g 2,5-Diphenyl-oxazol und 250 mg 1,4-Bis-(5-phenyl-oxazolyl-2)-benzol in 1000 ml Dioxan benutzt. Zur Messung wurden jeweils 0.5 ml der Restwasserphase in 19.5 ml des wasserlöslichen Szintillators gebracht.

Das Impulshöhenspektrum für die ^{14}C-Bestimmung wurde durch eine untere Begrenzung von 50 V und eine obere von 1000 V eingestellt, das für die ^{3}H-Messung mit 50-500 V begrenzt. Der 'background' im luftdicht abgeschlossenen System betrug bei dieser Einstellung für ^{14}C 30-35 Impulse/Minute und für ^{3}H 20-25 Impulse/Minute. Die mit einem Standard verglichene Zählausbeute betrug für ^{14}C 86 %, für ^{3}H 34 % der Theorie.

2.3 Inkubation und Extraktion

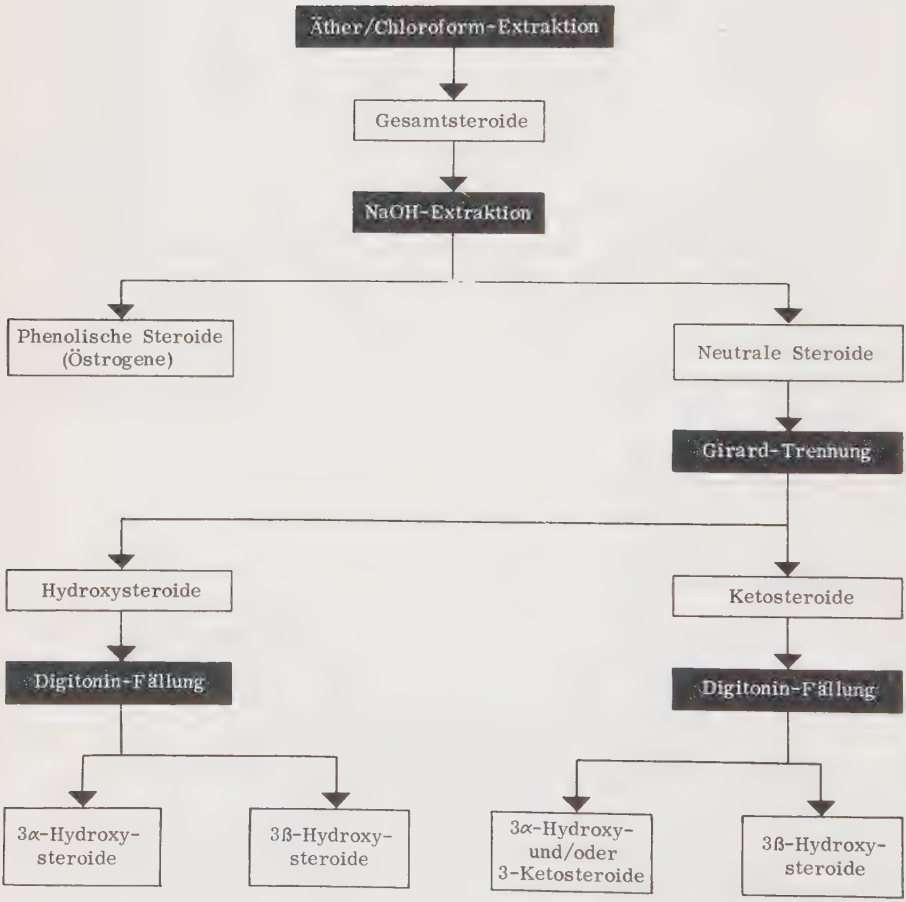
Das radioaktiv markierte Steroid wurde in einen 50 ml Schlifferlenmeyerkolben einpipettiert und unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Um das Steroid wieder in Lösung zu bringen, wurde mit 2 ml einer 3 %igen Lösung von Rinderalbumin in Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer pH 7.4 eine Stunde bei 41 °C vorinkubiert. Danach wurde das Ovargewebe (Homogenat oder Schnitte) zugegeben und die Inkubationskolben mit einem Gemisch von 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid begast. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der in Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer gelösten Cofaktoren gestartet. Menge und Art der Cofaktoren sind bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die verschlossenen Kolben wurden nun im Schütteltherm ostaten bei 41 °C, der Körpertemperatur der Hühner, inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug, wenn nicht anders angegeben, eine Stunde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 4 ml Äther/Chloroform (3 : 1) gestopt. Nach Schütteln, 1 Minute lang, wurde kurz zentrifugiert und die organische Phase abpipettiert. Es wurde noch dreimal mit je 4 ml Äther/Chloroform nachextrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und bei 40 °C unter Stickstoff zur Trockne gebracht.

2.4 Trennung der Metabolite

Vom wäßrigen Rückstand des Inkubatinnsansatzes wurde ein aliquoter Teil abgenommen, mit wasserlöslichem Szintillator versetzt und im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. So konnte festgestellt werden, ob während der Inkubation wasserlösliche Steroidkonjugate gebildet werden.

Die Aufarbeitung der Extrakte erfolgte nach dem in Abbildung 2 wiedergegebenen Schema. (Abbildung 2 s. S.10) Zuerst wurden die phenolischen Steroide (Östrogene) von den neutralen Steroiden durch Ausschütteln mit 1 n NaOH abgetrennt. In der neutralen Fraktion wurden danach die Steroide,

Abbildung 2: TRENNUNG DER METABOLITE.



die eine oder mehrere Ketogruppen tragen, von den reinen Hydroxysteroiden abgetrennt. Dies geschah durch Überführung der Ketosteroide in wasserlösliche Hydrazone mit Hilfe von Girard's Reagenz T (Trimethyl-acet-hydrazid-ammoniumchlorid). Beide Fraktionen+, die Keto- und die Hydroxysteroide, wurden danach mit Digitonin behandelt, um die 3ß-Hydroxysteroide abzutrennen.

2.4.1 Abtrennung der phenolischen Steroide (21)

Der Trockenrückstand des Extraktes wurde in 0.5 ml Äthanol und 15 ml Toluol gelöst und mit 4 x 4 ml 1 n NaOH extrahiert. Die vereinigten NaOH-Extrakte wurden mit 5 ml Hexan/Benzol (1:1) gewaschen und mit 25 %iger H_2SO_4 auf pH 5-6 eingestellt. Nach der Zugabe von 5 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung wurde mit 3 x 20 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte, welche die phenolischen Steroide enthielten, wurden mit 10 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und in Spitzgläsern bei 37 °C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Anschließend wurden die Proben 3 Stunden in Formamid/Chloroform chromatographiert.

2.4.2 Trennung in Keto- und Hydroxysteroide

Die Trennung der neutralen Fraktion in Keto- und Hydroxysteroide wurde mit Hilfe der modifizierten Girard-Trennung nach ISMAIL und HARKNESS (22) durchgeführt. Die Toluol-Phase, in der die neutralen Steroide nach der Extraktion mit NaOH verblieben waren, wurde mit 10 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen und unter Stickstoff zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 10 ml Äthanol gelöst. 400 mg Girard's Reagenz T (Trimethyl-acet-hydrazid-ammoniumchlorid) und 200 mg Amberlite-IRC-50 wurden zugegeben und die Mischung eine Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt. Die abgekühlte Probe

+Im Folgenden werden die so erhaltenen zwei Steroidfraktionen dem allgemeinen Sprachgebrauch folgend als Keto- und Hydroxysteroide bezeichnet. Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Ketosteroide auch Hydroxylgruppen tragen können, während die Hydroxysteroide keine Ketogruppen besitzen.

wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und der Überstand nach Zentrifugieren vom Rückstand durch Dekantieren getrennt. Der Rückstand wurde mit 2 ml Wasser nachgewaschen und danach verworfen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden dreimal mit je 10 ml Essigester extrahiert. Im Essigesterextrakt befanden sich die Hydroxysteroide. Der Extrakt wurde zweimal mit je 10 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter Stickstoff zur Trockne gebracht. In der wäßrigen Phase befanden sich die Hydrazone der Ketosteroide. Zur Spaltung der Hydrazone wurden 2 ml einer 30 %igen wäßrigen Formaldehydlösung zugegeben und die Probe über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die freien Ketosteroide wurden danach 3 x mit 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden 2 x mit je 5 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter Stickstoff zur Trockne gebracht.

2.4.3 Abtrennung der 3β-Hydroxysteroide

3β-Hydroxysteroide bilden mit Digitonin in Äther schwer lösliche Molekülverbindungen und können so von anderen Steroiden abgetrennt werden(23). Die Proben, d.h. die zur Trockne gebrachten Keto- und Hydroxysteroidfraktionen, wurden in 1 ml warmer 1 %iger Digitoninlösung in Äthanol aufgenommen. Die Proben wurden erhitzt, bis alles gelöst war und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurden 10 ml Äther zugegeben, davon etwa 7 ml tropfenweise und der Rest auf einmal. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Die ätherische Lösung mit den 3α-Hydroxy- bzw. 3-Ketosteroiden wurde dekantiert. Der Niederschlag wurde noch zweimal mit je 5 ml Äther gewaschen. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und bei 37°C unter Stickstoff zur Trockne gebracht. Die ausgefällten Digitonide der 3β-Hydroxysteroide wurden in 0.5 ml Pyridin bei 60-70 °C zersetzt. Das abgespaltene Digitonin wurde durch tropfenweisen Zusatz von 5 ml Äther ausgefällt. Der

Digitoninniederschlag wurde abzentrifugiert und die Pyridin-Ätherphase dekantiert. Der Niederschlag wurde nochmals in Pyridin gelöst und mit Äther gefällt. Die vereinigten Pyridin-Ätherextrakte wurden nacheinander mit je 2 ml 2 n H_2SO_4 und 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und bei 37 °C unter Stickstoff zur Trockne eingeengt.

Beide Fraktionen, also die 3ß-Hydroxysteroide und die 3α-Hydroxy- bzw. 3-Ketosteroide wurden chromatographiert, die ^{14}C-Progesteron- und ^{14}C-Δ^5-Pregnen-3ß-ol-20-on-metabolite für 3 Stunden in Formamid/n-Hexan und die ^{3}H-Androsten-3,17-dion- und ^{3}H-Testosteron-metabolite für 15 Stunden in Dimethylformamid/Cyclohexan. Die Aktivitätsverteilung auf den Papierstreifen wurde gemessen.

2.5 Nachweis einzelner Steroide

Die Identität der bei der Inkubation entstandenen Metabolite wurde festgestellt durch

a) den Vergleich von R_f- und R_s-Werten mit denen von Referenzsubstanzen und durch
b) die Bildung von Derivaten.

Die Derivate wurden gemeinsam mit den entsprechenden Derivaten der Referenzsubstanzen chromatographiert. Ein Vergleich der R_f- bzw. R_s-Werte führte in den meisten Fällen zur eindeutigen Identifizierung der Metabolite.

2.5.1 Acetylierung von primären und sekundären Steroidalkoholen mit Pyridin/Eisessig

Das eingeengte Eluat wurde mit 1 ml Pyridin/Eisessig (1:1) versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur belassen. Danach wurden 3 ml Methanol/Benzol (1:1) und 5 ml Wasser zugesetzt und mit 10 n NaOH auf pH 7 eingestellt. Die organische Phase wurde abgedampft und die Wasserphase mit 2 n H_2SO_4 auf pH 2 eingestellt. Mit 3 x 10 ml Äther wurde extrahiert und anschließend eingedampft.

Nach diesem Verfahren sind tertiäre Steroidalkohole(z.B. Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion)nicht acetylierbar.

2.5.2 Methylierung von phenolischen Steroiden nach BROWN (24)

Das Steroid wurde in 25 ml 1.6 %iger NaOH gelöst. Nach der Zugabe von 0.45 g H_3BO_3 und 1 ml Dimethylsulfat wurde 20 Minuten in einem Wasserbad von 37 °C geschüttelt. Danach wurden nochmals 1 ml Dimethylsulfat und 2 ml 20 %ige NaOH zugegeben und erneut 20 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Zur abgekühlten Probe wurden 10 ml 20 %ige NaOH und 2.5 ml 30 %iges H_2O_2 gegeben. Die methylierten Östrogene wurden mit 2 x 20 ml Benzol extrahiert. Die vereinigten Benzolextrakte wurden mit 5 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

2.5.3 Oxydation von sekundären Steroidalkoholen mit tertiärem Butylchromat (25)

Zur Herstellung des tertiären Butylchromats wurden 5 g CrO_3 portionsweise und unter Rühren zu einer gekühlten Mischung von 10 ml tertiärem Butylalkohol und 10 ml Tetrachlorkohlenstoff gegeben. Nach der Zugabe von 65 ml Tetrachlorkohlenstoff wurde die Mischung über eine mit Na_2SO_4 bedeckte Glasfritte gegeben. Das Filtrat mit dem tertiären Butylchromat wurde über Na_2SO_4 im Kühlschrank aufbewahrt.

Das trockene Steroid wurde mit 0.1 ml Pyridin und 0.1 ml der Butylchromatlösung versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur belassen. Zur Zerstörung des Butylchromats wurden danach 0.2 ml einer frisch bereiteten, gesättigten Lösung von Zitronensäure in Äthanol zugegeben. Die Mischung wurde 15 Minuten geschüttelt. Mit 1 ml 1n H_2SO_4 wurde angesäuert und mit 3 x 3 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Extrakte wurden nacheinander mit 1 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung, 1 ml 10 %iger $Na_2S_2O_5$-Lösung, 1 ml 1n NaOH und 1 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter Stickstoff eingeengt.

Sekundäre Hydroxylgruppen wurden so zu Ketogruppen oxydiert, tertiäre Hydroxylgruppen blieben unverändert.

2.5.4 Oxydation von 20ß-Hydroxysteroiden mit 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase und NAD^+ (26)

20ß-Hydroxysteroide lassen sich in Gegenwart von NAD mit stereospezifischer 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase zu den entsprechenden 20-Ketosteroiden oxydieren. Maximal 100 µg des Steroids wurden mit 1 Tropfen Äthanol gelöst. Nach Zugabe von 1.5 ml eines 0.15 m Phosphatpuffers(pH 8.0) der 2.7×10^{-3} Mol EDTA enthielt, wurde die Reaktion mit 4 mg NAD und 10 µg des Enzyms(Fa. Boehringer) gestartet. Es wurde 2 Stunden bei 37 °C im Schüttelthermostaten inkubiert und anschließend dreimal mit 5 ml Äther/Chloroform (3:1) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt.

2.5.5 Reduktion von 20-Ketosteroiden mit 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase und $NADH^+$ (26)

20-Ketosteroide lassen sich in Gegenwart von NADH mit 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase zu den entsprechenden 20ß-Hydroxysteroiden reduzieren. Maximal 100 µg des Steroids wurden mit einem Tropfen Äthanol gelöst. 1.5 ml eines 0.15 m Phosphatpuffers(pH 5.2) der 2.7×10^{-3} Mol EDTA enthielt, 4 mg NADH und 10 µg des Enzyms wurden zugegeben und die Probe für 2 Stunden bei 37 °C im Schüttelthermostaten inkubiert. Das reduzierte Steroid wurde mit 3 x 5 ml Äther/Chloroform (3:1) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt.

2.5.6 Reduktion von 17-Ketosteroiden mit Natriumborhydrid (27)

Die methanolische Lösung des Steroids wurde in einem Eisbad gekühlt, mit 1-3 mg $NaBH_4$ versetzt und eine Stunde im Eisbad belassen. Danach wurden 5 ml Wasser und etwa 5 Tropfen 1n Essigsäure zugegeben, um das überschüssige $NaBH_4$ zu zerstören.

+ NAD: Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH: reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid

Das Methanol wurde abgedampft und die wäßrige Phase dreimal mit je 5 ml Äther/Chloroform (3:1) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 3 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt.

17-Ketosteroide wurden so zu den entsprechenden 17-Hydroxysteroiden reduziert.

2.5.7 Abspaltung der C_{17}-Seitenkette mit Natriumwismutat (28)

Das Steroid wurde mit 2 Tropfen Äthanol gelöst. Danach wurden 5 ml Wasser und 1.5 g Natriumwismutat zugegeben und die Probe 90 Minuten im Dunkeln geschüttelt. Nach Zugabe von 3 ml 30 %iger $NaHSO_3$-Lösung wurde erneut 20 Minuten geschüttelt. Zur Hydrolyse wurde mit 1.5 ml konzentrierter HCL angesäuert und geschüttelt, bis sich der Niederschlag völlig gelöst hatte. Nun wurde 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, unter Leitungswasser abgekühlt und mit 2 x 20 ml Benzol extrahiert. Die vereinigten Benzolextrakte wurden mit 5 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung, 5 ml 3n NaOH und 5 ml 10 %iger Na_2SO_4-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt.

Bei dieser Behandlung wird die C_{17}-Seitenkette von 17α, 20-Dihydroxysteroiden abgespalten und die entsprechenden Ketosteroide entstehen. An 17α-Hydroxy-20-Ketosteroiden wird die Seitenkette nicht abgespalten, es sei denn, die 20-Ketogruppe wurde vorher mit Natriumborhydrid oder 20ß-Hydroxysteroid-dehydrogenase reduziert.

3. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

3.1 Radioaktives Material

4-^{14}C-Progesteron und 4-^{14}C-Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on (Radiochemical Center, Amersham, Engl.) wurden im System Formamid/n-Hexan 3 Stunden chromatographiert und durch Elution der entsprechenden Zonen von aktiven und inaktiven Verunreinigungen abgetrennt. Durch Messung der ^{14}C-Aktivität eines aliquoten Teils wurde festgestellt, daß die Wiederfindung nach Chromatographie und Elution beim 4-^{14}C-Progesteron 91 % und beim 4-^{14}C-Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on 88 % betrug.

6-^{3}H-Testosteron (Fa.Schering AG, Berlin) wurde durch 15-stündige Chromatographie im System Dimethylformamid/Cyclohexan gereinigt. Es wurden 86 % der ^{3}H-Aktivität wiedergefunden.

6-^{3}H-Δ^4-Androsten-3,17-dion wurde aus gereinigtem 6-^{3}H-Testosteron durch Oxydation mit Butylchromat hergestellt. Nach chromatographischer Reinigung in Dimethylformamid/Cyclohexan betrug die Ausbeute an 6-^{3}H-Δ^4-Androsten-3,17-dion 81 %.

3.2 Gewinnung des Gewebes

Als Versuchstiere wurden HNL-Legehennen verwendet. Die Tiere wurden eine Stunde nach der Eiablage getötet. Das Ovar wurde entfernt und in gekühlten Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer, pH 7.4, gegeben. Das Eigelb der größten Follikel wurde abgesaugt und das Bindegewebe soweit wie möglich entfernt. Von dem verbliebenen Gewebe wurden nun entweder Schnitte angefertigt oder ein Homogenat hergestellt.

Die Anfertigung der Schnitte erfolgte mit einer Rasierklinge. Jeweils 100 mg Gewebe wurden für einenVersuch verwendet. Zur Herstellung des Homogenats wurde das Gewebe gewogen, im Verhältnis 1 : 5 (g/v) mit Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer versetzt und eine Minute im Homogenisator (Potter-Elvehjem) mit etwa 700 U/Min. zerkleinert. Das Homogenat wurde durch Gaze filtriert und das nicht filtrierbare Bindegewebe gewogen. Das Filtrat wurde mit so viel Puffer verdünnt, daß ein Gewebe : Puffer-Verhältnis von 1 : 10 (g/v) resultierte.

Die Aufarbeitung des Gewebes war eine Stunde nach Dekapitieren des Tieres beendet.

3.3 Versuche mit 4-^{14}C-Progesteron

Im ersten Versuch sollte untersucht werden, welche Steroide sich bei der Metabolisierung von Progesteron durch Ovarhomogenat bilden.

1.1 mMol 4-^{14}C-Progesteron (25 µCi) wurden mit 400 mg Homogenat eine Stunde inkubiert. Das entsprach einer Konzentration von 0.275 µMol Progesteron/100 mg Gewebe. Als Cofaktoren wurden 30 mg NADP[+], 86 mg Glukose-6-phosphat, 25 mg Nicotinsäureamid und 0.5 µg Glukose-6-phosphat-dehydrogenase zugesetzt. Die Cofaktoren wurden in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer gelöst.

3.3.1 Trennung der Metabolite

Nach Abtrennung der phenolischen Steroide wurden die neutralen Steroide mit Girard's-Reagenz T in Keto- und Hydroxysteroide getrennt. Nach der Chromatographie in Formamid/n-Hexan ergaben sich die in den Abbildungen 3 und 4 festgehaltenen Aktivitätsverteilungen.

[+] NADP: Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat

Abb. 3: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der Ketosteroidfraktion nach der Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden)

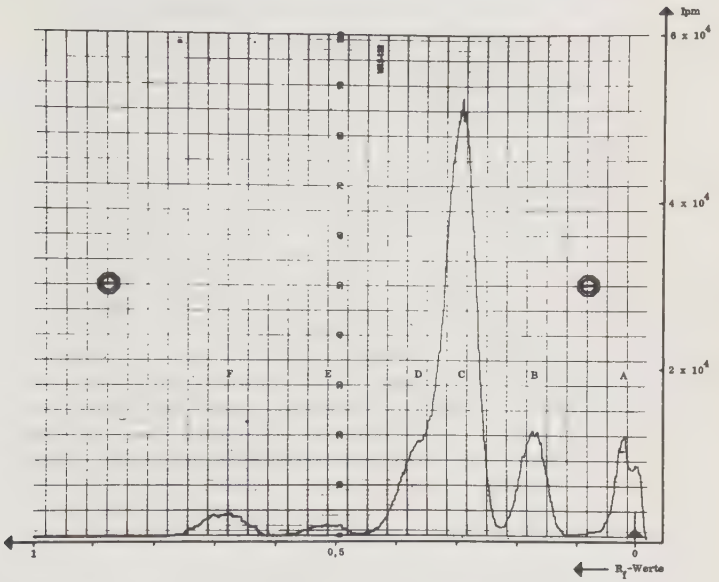
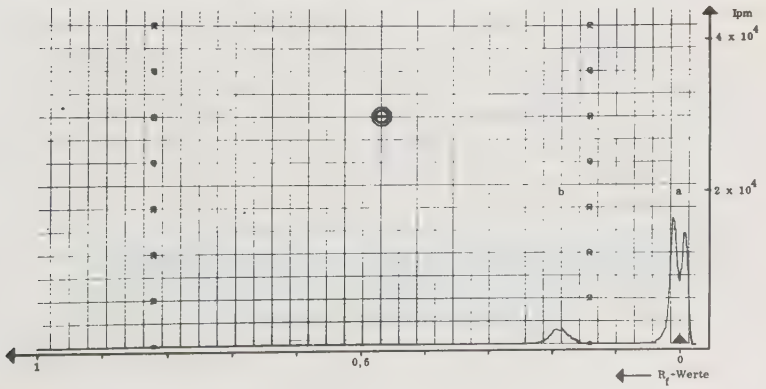


Abb. 4: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der Hydroxysteroidfraktion nach der Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden)



Von der Keto- und der Hydroxysteroidfraktion wurden die 3β-Hydroxysteroide durch Fällung mit Digitonin abgetrennt (Abbildungen 5 - 8).

Abb. 5: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Ketosteroide nach der Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden)

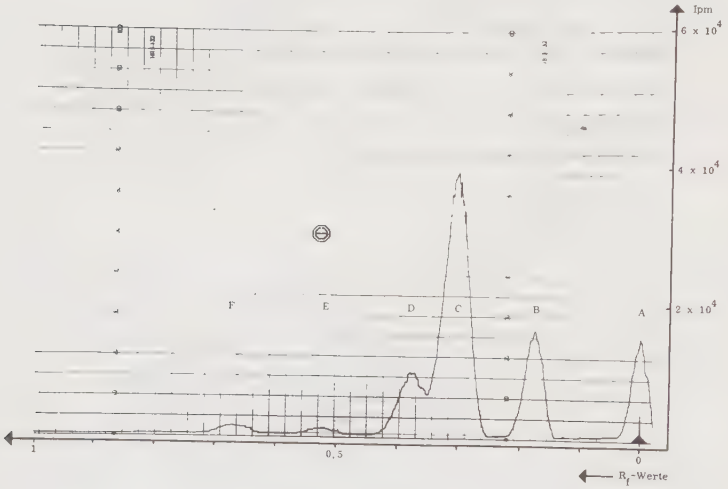


Abb. 6: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin fällbaren Ketosteroide nach der Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden)

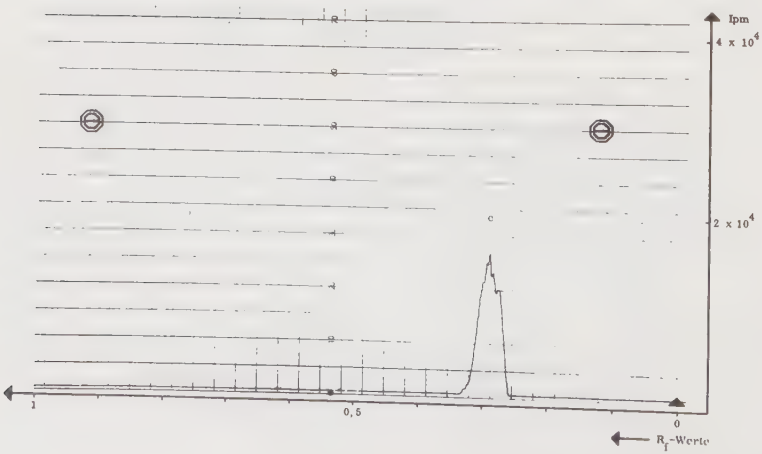


Abb. 7: ^{14}C-Aktivitätsverteilung nach der Chromatographie der mit Digitonin nicht fällbaren Hydroxysteroide in Formamid/n-Hexan (3 Stdn.)

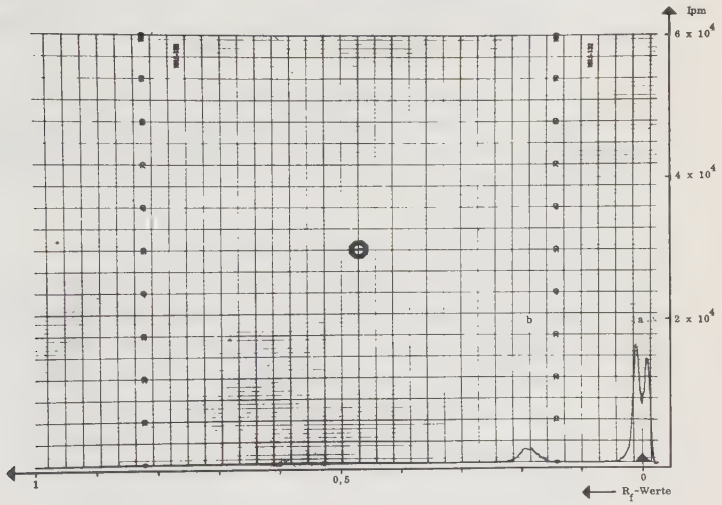
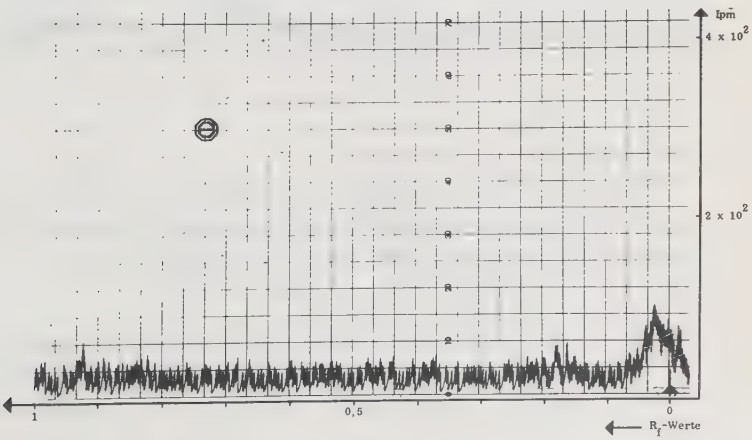
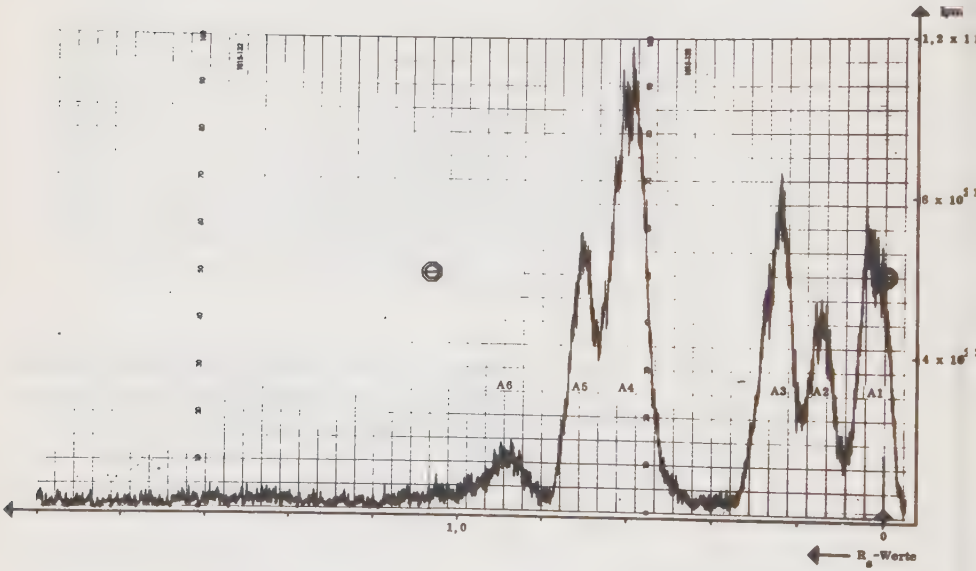


Abb. 8: ^{14}C-Aktivitätsverteilung nach der Chromatographie der mit Digitonin fällbaren Hydroxysteroide in Formamid/n-Hexan (3 Stunden)



Der Aktivitäts-Peak A (Abbildung 5) der ketonischen Fraktion wurde zur weiteren Auftrennung für 45 Stunden in Formamid/n-Hexan rechromatographiert. Die ^{14}C-Aktivitätsverteilung nach der Rechromatographie ist in Abbildung 9 dargestellt.

Abb. 9: ^{14}C-Aktivitätsverteilung nach der Chromatographie von Zone A in Formamid/n-Hexan (45 Stdn.



Der Durchlauf des Chromatogramms wurde aufgefangen und in Propylenglykol/Toluol 5 Stunden chromatographiert. Es wurden zwei kleine ^{14}C-Aktivitäts-Peaks bei R_f = 0.51 (A7) bzw. 0.80 (A8) festgestellt.

Bei der Messung des wäßrigen Rückstandes des Inkubationsansatzes mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler wurde keine ^{14}C-Aktivität festgestellt. Daraus kann gefolgert werden, daß bei der Inkubation von Progesteron mit Ovarhomogenat keine Steroidkonjugate gebildet wurden.

3.3.2 Identifizierung der Metabolite

Alle in den Abbildungen 5 - 9 dargestellten Aktivitätszonen wurden einzeln eluiert und in Propylenglykol/Toluol rechromatographiert.

a. Mit Digitonin nicht fällbare Ketosteroide

Zone A1: Die R_s- bzw. R_f-Werte des Metaboliten A1 stimmten sowohl in Formamid/n-Hexan (45 Stunden) als auch in Propylenglykol/Toluol mit denen von Corticosteron überein. Nach Zusatz von inaktivem Corticosteron wurde im System Formamid/Benzol (3 Stunden) rechromatographiert. Der Aktivitäts-Peak deckte sich mit der UV-positiven Zone von Corticosteron. Auch nach Reduktion mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase und Chromatographie in Formamid/Benzol (15 Stunden) fielen Aktivitäts-Peak und UV-positive Zone zusammen. (R_s = 0.1, S = Corticosteron). Die R_f-Werte der markierten und der UV-positiven Substanz stimmten auch nach Acetylierung der reduzierten Verbindungen und anschließender dreistündiger Chromatographie in Formamid/Benzol überein (R_f = 0.74). Der Progesteronmetabolit A1 ist danach mit Corticosteron identisch.

Zone A2: Die R_f- bzw. R_s-Werte von Zone A2 stimmten nach Chromatographie in Formamid/n-Hexan, Propylenglykol/Toluol und Formamid/Benzol mit denen von Δ^4-Pregnen-6β-ol-3,20-dion überein. Der mit inaktivem Δ^4-Pregnen-6β-ol-3,20-dion verschnittene Metabolit A2 wurde mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase reduziert und in Formamid/Benzol (3 Stunden) chromatographiert. Die R_f-Werte der markierten Verbindung und der Referenzsubstanz waren identisch (R_f = 0.19). Auch nach Acetylierung der reduzierten Verbindungen und Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) konnte kein Unterschied in der Laufstrecke festgestellt werden (R_f = 0.58). Damit war bewiesen, daß es sich bei dem Metaboliten A2 um Δ^4-Pregnen-6β-ol-3,20-dion handelt.

Zone A4: Die Aktivitätszone A4 teilte sich bei der Chromatographie in Propylenglykol/Toluol in zwei Peaks mit den R_f-Werten 0.49 bzw. 0.58 auf. Das entsprach den R_f-Werten von Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion bzw. Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion (Desoxycorticosteron, 'DOC'). Um zu klären, ob es sich bei dem Peak mit R_f = 0.49 tatsächlich um Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion handelt, wurde die entsprechende Zone eluiert, mit der inaktiven Verbindung verschnitten und mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase reduziert. Nach der Chromatographie in Propylenglykol/Toluol ergab sich für den Aktivitäts-Peak und die UV-positive Zone ein R_f-Wert von 0.27. Übereinstimmend mit der Erfahrung, daß sich tertiäre Hydroxylgruppen unter den gegebenen Bedingungen nicht acetylieren lassen, ließ sich auch von der markierten Verbindung kein Acetat darstellen.
Bei der Oxydation mit Natriumwismutat wurde weder die markierte noch die inaktive Verbindung verändert. Erst nach Reduktion mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase ließ sich die C_{17}-Seitenkette mit Natriumwismutat abspalten. Es entstand eine Substanz, die in Propylenglykol/Toluol so weit wie Δ^4-Androsten-3,17-dion wanderte. Damit war bewiesen, daß der polarere der beiden Metaboliten der Zone A4 Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion war.

Der zweite Metabolit der Zone A4 verhielt sich, wie bereits erwähnt, chromatographisch wie Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion. Auch nach Reduktion des mit inaktiver Vergleichssubstanz verschnittenen Metaboliten durch 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase war im System Formamid/Benzol kein Unterschied zwischen UV-positiver Zone und Aktivitäts-Peak festzustellen (R_f = 0.17). Die Acetylierung der reduzierten Verbindung und die anschließende Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) erbrachte den endgültigen Beweis für die Identität des Metaboliten mit Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion, denn der R_f-Wert von 0.34 war für markierte Verbindung und Referenzsubstanz gleich.

Die Aktivitätszonen A3, A5 und A6 wurden nicht identifiziert, da keine der Referenzsubstanzen, die zur Verfügung standen, entsprechendes chromatographisches Verhalten zeigte und die Substanzmengen für die Identifikation ohne Referenzsubstanzen zu gering waren.

In Abbildung 9, der Darstellung der Aktivitätsverteilung nach der Rechromatographie von Zone A in Formamid/n-Hexan (45 Stunden), müßte mit dem R_s-Wert von 1.0 Testosteron erscheinen. An dieser Stelle war jedoch, wie dargestellt, mit dem Methandurchflußzähler keine Aktivität feststellbar. Zum Nachweis möglicherweise in äußerst geringer Menge gebildeten Testosterons wurde daher der empfindlichere Flüssigkeitsszintillationszähler benutzt. Der Bereich mit R_s = 1 wurde eluiert, mit inaktivem Testosteron verschnitten und in Propylenglykol/Toluol chromatographiert. Die UV-positive Testosteronzone wurde erneut eluiert und in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden) rechromatographiert. Nach abermaliger Elution wurde das Testosteron mit Butylchromat zu Δ^4-Androsten-3,17-dion oxydiert. Nach der Chromatographie in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden) wurde die UV-positive Zone eluiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die ^{14}C-Aktivität betrug 1 900 Impulse/Minute. Es kann also mit Sicherheit gesagt werden, daß bei der Metabolisierung von Progesteron auch Testosteron gebildet wurde, wenn auch in äußerst geringer Menge.

Zone A7: Der R_f-Wert von 0.51 in Propylenglykol/Toluol stimmte mit dem von Δ^4-Pregnen-20α-ol-3-on überein. Bei der Oxydation mit Butylchromat entstand eine Verbindung, die in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) so weit wie Progesteron wanderte. Der Metabolit ließ sich mit 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase weder reduzieren noch oxydieren. Es konnte also weder eine 20-Keto- noch eine 20ß-Hydroxygruppe vorliegen. Bei der Acetylierung entstand eine Verbindung, die in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) den gleichen R_f-Wert hatte wie Δ^4-Pregnen-20α-ol-3-on-acetat. Die markierte Verbindung der Zone A7 war also mit Δ^4-Pregnen-20α-ol-3-on identisch.

Zone A8: Dieser Metabolit verhielt sich in Propylenglykol/Toluol und in Formamid/n-Hexan wie Δ^4-Androsten-3,17-dion. Bei der Reduktion mit Natriumborhydrid entstand eine Verbindung, die in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden) die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Testosteron hatte. Die reduzierte Verbindung ließ sich, im Gegensatz zum unveränderten Metaboliten, acetylieren. Das Acetat unterschied sich in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) nicht von Testosteronacetat. Beim Metaboliten A8 handelt es sich folglich um Δ^4-Androsten-3,17-dion.

Zone B: Der Metabolit B hatte in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) und in Propylenglykol/Toluol die gleichen R_f-Werte wie Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on. Sowohl bei der Oxydation mit Butylchromat als auch bei der Oxydation mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase entstanden Verbindungen, die in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) mit Progesteron identisch waren. Die oxydierte Verbindung ließ sich, im Gegensatz zur unbehandelten Probe, nicht acetylieren. Das Acetat der unbehandelten Verbindung hatte in Formamid/n-Hexan den gleichen R_f-Wert wie Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on-acetat. Der Metabolit B mußte mit Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on identisch sein.

Zone C: Die Verbindung C blieb bei der Acetylierung, bei der Oxydation mit Butylchromat und bei der Oxydation mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase unverändert. Bei der enzymatischen Reduktion entstand eine Verbindung, die in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) den gleichen R_f-Wert wie Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on hatte und die nach der anschließenden Acetylierung ebenso weit wie Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on-acetat wanderte. Die Verbindung C ist das nicht umgesetzte Progesteron.

Zone D: Der Metabolit D hatte in Propylenglykol/Toluol einen R_f-Wert von 0.54. Bei der Oxydation mit Butylchromat entstand ein Derivat, das in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) den R_f-Wert von 5β-Pregnan-3,20-dion aufwies, bei der Oxy-

dation mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase dagegen veränderte sich die Verbindung nicht. Die enzymatische Reduktion ergab ein Derivat mit R_f = 0.18 in Formamid/n-Hexan (3 Stunden). Das entsprach der Laufstrecke von 5β-Pregnan-3α,20β-diol. Das Acetat des Metaboliten D hatte, ebenso wie das Acetat von 5β-Pregnan-3α-ol-20-on einen R_f-Wert von 0.90. Damit war der Beweis erbracht, daß es sich bei D um 5β-Pregnan-3α-ol-20-on handelte.

Zone E: Sowohl bei der Oxydation mit Butylchromat als auch bei der Oxydation mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase entstanden Derivate, die sich chromatographisch wie 5β-Pregnan-3,20-dion verhielten. Bei der Acetylierung entstand eine Verbindung, die in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) einen R_f-Wert von 0.92 hatte. Die oxydierte Verbindung ließ sich nicht acetylieren. Der Metabolit E war folglich mit 5β-Pregnan-20β-ol-3-on identisch.

Zone F: Dieser Metabolit wanderte in Propylenglykol/Toluol in der Front. Das entsprach ebenso wie der R_f-Wert von 0.67 in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) der Laufstrecke von 5β-Pregnan-3,20-dion. Der Metabolit ließ sich weder mit Butylchromat noch mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase oxydieren. Bei der Reduktion mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase entstand ein Derivat, das in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) den gleichen R_f-Wert wie der Metabolit E (5β-Pregnan-20β-ol-3-on) hatte. Dieses Derivat ließ sich auch , im Gegensatz zur unveränderten Verbindung, acetylieren. Damit war der Beweis erbracht, daß der Metabolit F 5β-Pregnan-3,20-dion war.

b. Mit Digitonin fällbare Ketosteroide

Mit Digitonin ließ sich nur ein Metabolit aus der Ketosteroidfraktion ausfällen (s. Abbildung 6). Dieser Metabolit, der also eine 3β-Hydroxylgruppe haben mußte, hatte im System Propylenglykol/Toluol einen R_f-Wert von 0.54. Er ließ sich

mit Butylchromat zu 5β-Pregnan-3,20-dion oxydieren (R_f = 0.68 in Formamid/n-Hexan) und mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase reduzieren (R_f = 0.18 in Formamid/n-Hexan). Es konnte sich folglich nur um 5β-Pregnan-3β-ol-20-on handeln.

c. Mit Digitonin nicht fällbare Hydroxysteroide

Die ^{14}C-Verteilung der Fraktion der mit Digitonin nicht fällbaren Hydroxysteroide ist in Abbildung 7 dargestellt. Der Start-Peak a wurde nicht identifiziert. Bei der Rechromatographie in Formamid/n-Hexan (45 Stunden) trennte er sich in mehrere kleine Peaks auf. Es handelt sich wahrscheinlich um Pregnantriole.

Der Peak b wanderte in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) in Propylenglykol/Toluol und Formamid/Benzol jeweils so weit wie 5β-Pregnan-3α,20β-diol. Bei der Oxydation mit Butylchromat entstand 5β-Pregnan-3,20-dion (R_f = 0.69 in Formamid/n-Hexan), während bei der Oxydation mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase 5β-Pregnan-3α-ol-20-on gebildet wurde (R_f = 0.37 in Formamid/n-Hexan). Das Acetat des Metaboliten wanderte in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) mit der Lösungsmittelfront, während das Acetat der enzymatisch oxydierten Verbindung im gleichen System einen R_f-Wert von 0.9 hatte. Das beweist die Identität des Metaboliten b mit 5β-Pregnan-3α,20β-diol.

d. Mit Digitonin fällbare Hydroxysteroide

Di- oder Trihydroxysteroide mit einer 3β-Hydroxylgruppe konnten mit dem Methandurchflußzähler nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 8).

e. Phenolische Steroide (Östrogene)

Die durch Extraktion mit Natronlauge abgetrennte Phenolfraktion wurde im System Formamid/Chloroform chromatographiert. Mit dem Methandurchflußzähler konnte auf dem Papier-

streifen keine ^{14}C-Aktivität festgestellt werden. Es wurde untersucht, ob bei der empfindlicheren Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler markierte Östrogene nachzuweisen waren. Die Östron-, Östradiol- und Östriolzonen wurden getrennt eluiert, mit den entsprechenden inaktiven Östrogenen verschnitten und einzeln im System Formamid/Benzol rechromatographiert. Nach abermaliger Elution wurden die drei Östrogenfraktionen mit Dimethylsulfat methyliert und anschließend in Dimethylformamid/Cyclohexan (5 Stunden) chromatographiert. Die Östrogenmethyläther wurden eluiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. In den Proben mit Östradiol- und Östriolmethyläther war keine ^{14}C-Aktivität nachzuweisen. Die Messung des Östronmethyläthers ergab 100 Impulse/Minute.

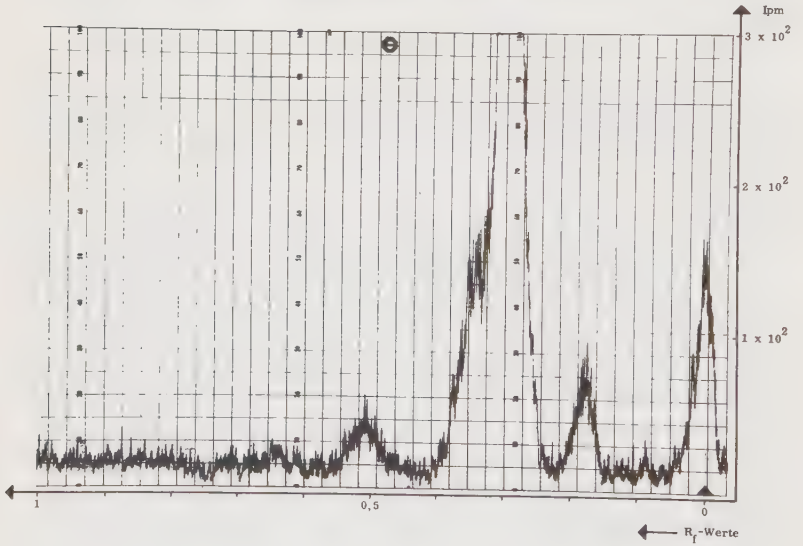
3.3.3 Abhängigkeit der Metabolisierungsrate von der Inkubationsdauer.

Die quantitative Bestimmung der Bildungsraten der verschiedenen Metabolite bei in vitro Versuchen mit Gewebehomogenat ist von geringerer Aussagekraft im Hinblick auf die Bildungsraten in vivo, da die natürlichen Bedingungen nur in sehr grober Annäherung simuliert werden können. Faktoren wie Inkubationsdauer, Verhältnis Gewebe zu Substrat und die Cofaktormenge werden mehr oder weniger willkürlich festgelegt und verbieten einen Rückschluß auf die Bildungsrate in vivo. Die Folgerung auf das Enzymspektrum aufgrund der qualitativen Auswertung der Versuche ist dagegen gestattet, mit der Einschränkung, das nur eine 'positive Aussage' gemacht werden kann, d.h. das Fehlen eines bestimmten Metaboliten erlaubt nicht die Aussage, daß auch das entsprechende Enzym fehlt.

Eine größere Annäherung an in vivo Bedingungen kann durch die Verwendung von Gewebeschnitten anstelle von Gewebehomogenat erreicht werden. Der unzerstörte Zellverband kann dann auf das Substrat einwirken. Eine Simulation durch Cofaktoren ist nicht notwendig.

Es wurden 0.275 µMol 4-^{14}C-Progesteron (1 µCi) mit 100 mg Gewebeschnitten eine Stunde inkubiert. Dem Inkubationsansatz wurden 8 mg Glukose zugesetzt, das ergab eine Glukosekonzentration von 200 mg%.
Die ^{14}C-Aktivitätsverteilung nach der Extraktion und der Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) ist in Abbildung 10 dargestellt.

Abb. 10: ^{14}C-Aktivitätsverteilung nach der Metabolisierung von 88 µg 4-^{14}C-Progesteron mit 100mg Gewebeschnitten und anschließender Chromatographie in Formamid/n-Hexan (3 Stunden)



Aus Abbildung 10 ist zu ersehen, daß die Verteilung der Metabolite etwa die gleiche ist wie beim Versuch mit Homogenat (s. Abbildungen 3 und 4). Allerdings betrug der Progesteronumsatz mit Schnitten nur etwa 5 % des Umsatzes mit Homogenat.

Die Feststellung der Abhängigkeit der Bildungsraten einzelner Metabolite von der Inkubationsdauer gestattet mitunter Aussagen über die Reihenfolge der verschiedenen Metabolisierungsreaktionen.

In einem weiteren Versucn wurden daher jeweils 0.275 µMol 4-^{14}C-Progesteron (1 µCi) mit 1 ml Homogenat (100 mg Gewebe) 0.5, 1, 2 und 4 Stunden inkubiert. Als Cofaktoren wurden 7.5 mg NADP, 21.5 mg Glukose-6-phosphat, 6 mg Nikotinsäureamid und 0.125 µg Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer gelöst, zugegeben. Es wurde der prozentuale Anteil einiger Metabolite an der Gesamtaktivität bestimmt. Diese Metabolite waren 5β-Pregnan-3,20-dion, 5β-Pregnan-3α-ol-20-on, 5β-Pregnan-3α,20β-diol, Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on und Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion. Außerdem sollte die Menge des nicht umgesetzten Progesteron bestimmt werden.

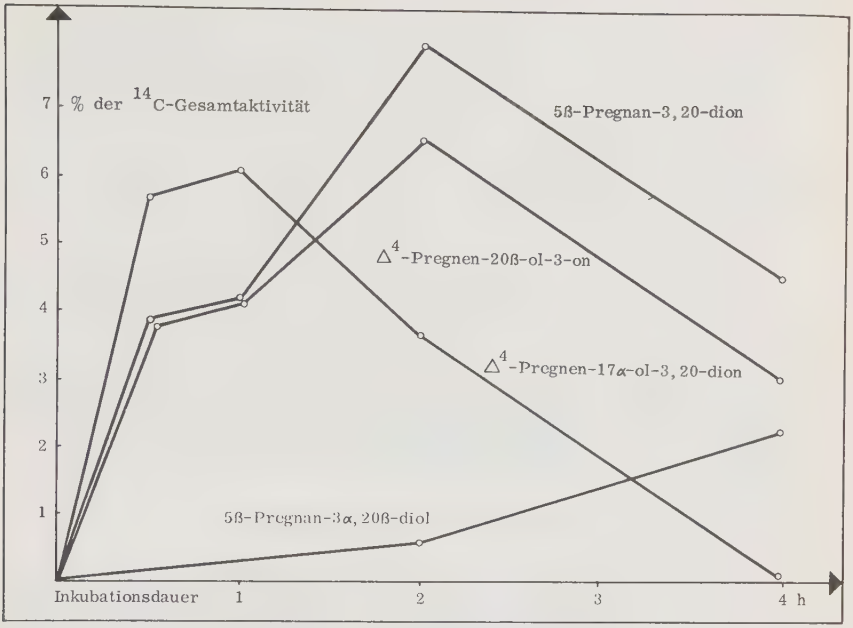
Die Extrakte der verschiedenen Inkubationsansätze wurden 4 Stunden in Formamid/n-Hexan chromatographiert. Die ^{14}C-Aktivitätsverteilung wurde bestimmt. Dies geschah durch Ausschneiden und Wägen der einzelnen Peaks.

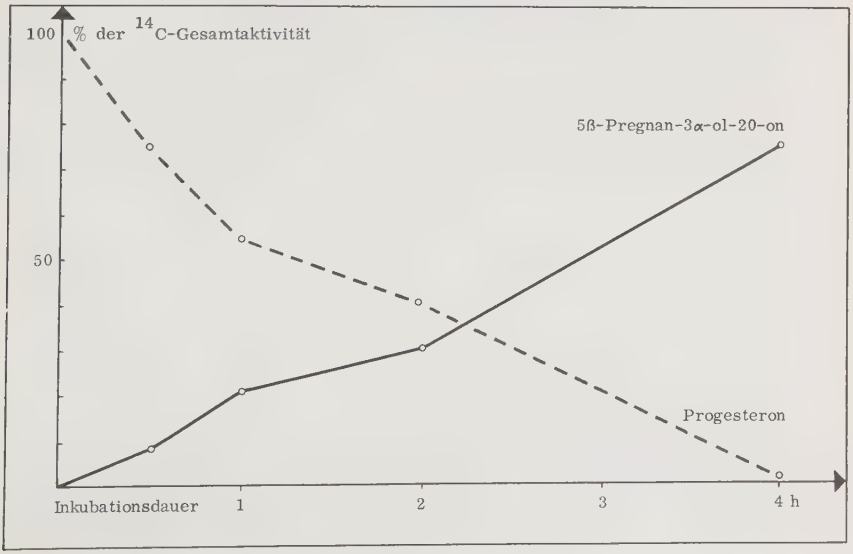
Nach den Erfahrungen des ersten Versuches waren nach der vierstündigen Chromatographie in Formamid/n-Hexan von den in Frage kommenden Metaboliten nur 5β-Pregnan-3,20-dion und 5β-Pregnan-3α-ol-20-on von anderen markierten Produkten abgetrennt. Zur Isolierung von Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion wurde der Start-Peak (Zone A) eluiert und 45 Stunden in Formamid/n-Hexan rechromatographiert. Die Zone B wurde in Propylenglykol/Toluol rechromatographiert. Dadurch wurden Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on und 5β-Pregnan-3α,20β-diol voneinander getrennt. Zur Isolierung von Progesteron wurde die Zone C in Propylenglykol/Toluol rechromatographiert. Die prozentuale ^{14}C-Aktivitätsverteilung wurde nach der Rechromatographie jeweils neu bestimmt, bezogen auf den Anteil an der Gesamtaktivität, den der entsprechende Peak nach der ersten Chromatographie hatte. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 bzw. den Abbildungen 11a und 11b wiedergegeben.

Tab.3: Die Bildungsraten verschiedener Metabolite von 4-^{14}C-Progesteron in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Metabolite	Inkubationsdauer in Stunden			
	0.5	1	2	4
5β-Pregnan-3,20-dion	3.9 %	4.2 %	8.0 %	4.6 %
5β-Pregnan-3α-ol-20-on	7.7 %	20.6 %	30.0 %	74.0 %
5β-Pregnan-3α,20β-diol	<0.1 %	<0.1 %	0.6 %	2.3 %
Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on	3.9 %	4.2 %	6.5 %	3.1 %
Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion	5.7 %	6.1 %	3.7 %	0.2 %
Progesteron	75.0 %	54.6 %	40.0 %	<0.1 %

Abbildungen 11a und 11b: DIE METABOLISIERUNG VON 4-^{14}C-PROGESTERON IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSDAUER.





3.4 Versuche mit 4-^{14}C-Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on

Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on ist bei der Steroidbiosynthese in allen endokrinen Organen die Vorstufe von Progesteron(1). Außerdem ist es der Ausgangspunkt für einen 'zweiten Biosyntheseweg', der über Δ^5-Pregnen-3β,17α-diol-20-on, Δ^5-Androsten-3β-ol-17-on (Dehydroepiandrosteron) zum Δ^4-Androsten-3,17-dion führt (s. Abbildung 1).
Es sollte untersucht werden, ob auch das Ovar des Legehuhns in der Lage ist, diese Syntheseschritte durchzuführen.

0.275 µMol 4-^{14}C-Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on (6 µCi) wurden mit 100 mg Gewebehomogenat eine Stunde inkubiert. Als Cofaktoren wurden 7.5 mg NADP, 4 mg NAD, 21.5 mg Glukose-6-phosphat, 6 mg Nikotinsäureamid und 0.125 µg Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer gelöst, zugegeben.

3.4.1 Trennung der Metabolite

Die Trennung der Metabolite wurde entsprechend der Trennung der Progesteronmetabolite durchgeführt. Nach Abtrennung der phenolischen Steroide wurde die neutrale Fraktion mit Hilfe der Girard-Reaktion in Keto- und Hydroxysteroide aufgeteilt. Anschließend wurden beide Fraktionen mit Digitonin behandelt, um die 3β-Hydroxyverbindungen abzutrennen. Die ^{14}C-Aktivitätsverteilung nach der Chromatographie der vier Fraktionen in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) ist in den Abbildungen 12-15 dargestellt.

Abb. 12: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Ketosteroide.

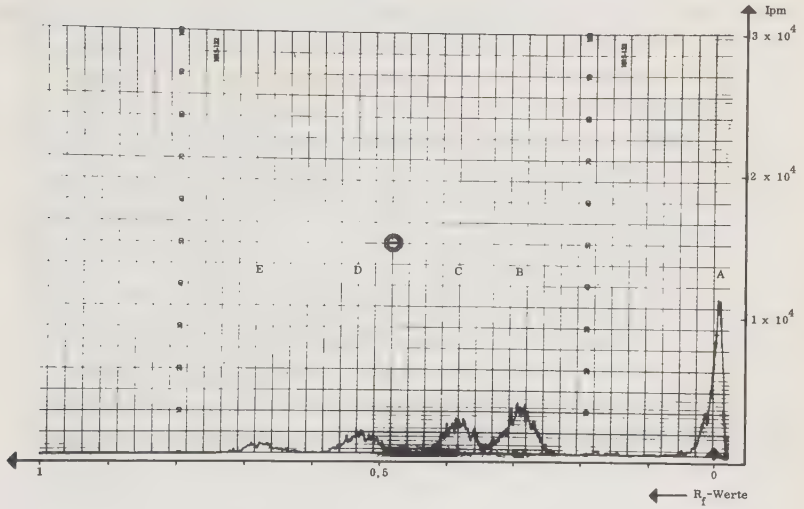


Abb. 13: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin fällbaren Ketosteroide

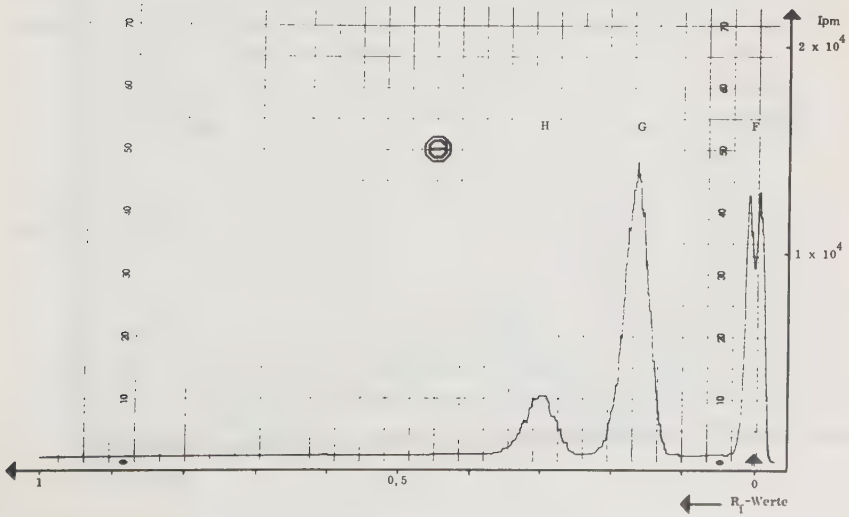


Abb. 14: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Hydroxysteroide

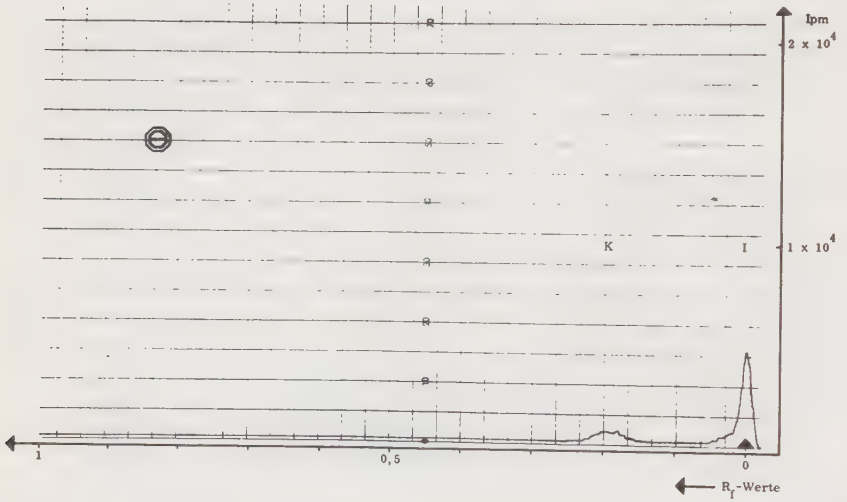
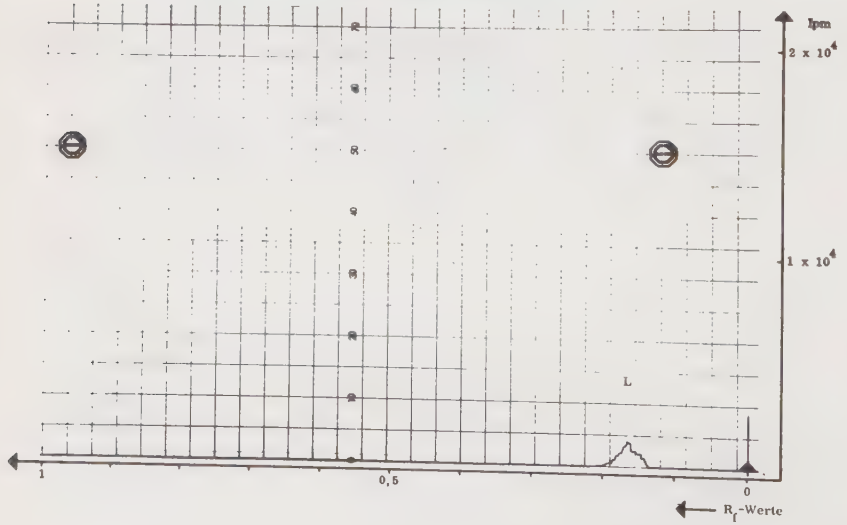


Abb. 15: ^{14}C-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin fällbaren Hydroxysteroide



Bei der Messung des wäßrigen Rückstandes des Inkubationsansatzes mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler wurde keine ^{14}C-Aktivität festgestellt. Bei der Inkubation von Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on mit Ovarhomogenat wurden demnach keine Steroidkonjugate gebildet.

.4.2 Identifizierung der Metabolite

Es sollte festgestellt werden, ob bei der Metabolisierung von Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on durch Ovarhomogenat Progesteron, Δ^5-Pregnen-3β,17α-diol-20-on, Δ^5-Androsten-3β-ol-17-on, Δ^4-Androsten-3,17-dion und Östrogene entstanden sind.

Progesteron müßte in der Fraktion der mit Digitonin nicht fällbaren Steroidketone erscheinen (s. Abbildung 12). Tatsächlich trat an der Stelle des Progesterons (R_f = 0.29) ein Peak auf, der sich auch nach der Rechromatographie in Propylenglykol/Toluol nicht von Progesteron unterschied. Der Metabolit ließ sich nicht acetylieren. Bei der Reduktion mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase entstand ein Derivat, das in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) so weit wie Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on wanderte. Der reduzierte Metabolit ließ sich acetylieren. Das Acetat lief in Formamid/n-Hexan (3 Stunden) nahe der Lösungsmittelfront (R_f = 0.95), genau wie Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on-acetat. Der Nachweis von Progesteron war damit erbracht.

Δ^5-Pregnen-3β,17α-diol-20-on müßte aufgrund seiner 3β-Hydroxylgruppe in der Fraktion der mit Digitonin fällbaren Ketosteroide erscheinen (Abbildung 13). Der Start-Peak F wurde in Propylenglykol/Toluol rechromatographiert, die inaktivem Δ^5-Pregnen-3β,17α-diol-20-on entsprechende Zone wurde eluiert und im System Formamid/Benzol chromatographiert. Der Aktivitäts-Peak deckte sich mit dem der Referenzsubstanz. Die entsprechende Zone wurde eluiert und mit 20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase reduziert. Es entstand ein Derivat, das in Formamid/Benzol die gleiche Laufstrecke wie

die entsprechend reduzierte Vergleichssubstanz hatte (R_f = 0.21). Die C_{17}-Seitenkette des enzymatisch reduzierten Metaboliten ließ sich mit Natriumwismutat abspalten. Es entstand dabei Δ^5-Androsten-3β-ol-17-on, wie durch Chromatographie in Propylenglykol/Toluol nachgewiesen werden konnte. Die Identität des Metaboliten F mit Δ^5-Pregnen-3β,17α-diol-20-on war damit erwiesen.

Δ^5-Pregnen-3β-ol-17-on müßte ebenfalls zur Fraktion der mit Digitonin fällbaren Ketosteroide gehören. Nach Rechromatographie in Propylenglykol/Toluol und Formamid/Benzol war mit dem Methandurchflußzähler an der Stelle der Referenzsubstanz keine ^{14}C-Aktivität nachzuweisen. Die entsprechende Zone wurde eluiert, mit inaktiver Vergleichssubstanz verschnitten, mit Natriumborhydrid reduziert und in Formamid/Benzol chromatographiert. Die reduzierte Referenzsubstanz hatte einen R_f-Wert von 0.36.
Die Zone wurde eluiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Eine ^{14}C-Aktivität von 120 Impulsen/Minute wurde festgestellt. Das beweist, daß unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nur Spuren von Δ^5-Androsten-3β-ol-17-on gebildet wurden.

Die Δ^4-Androsten-3,17-dion-Zone der mit Digitonin nicht fällbaren Steroidketone (R_f = 0.08 in Formamid/n-Hexan) wurde in Propylenglykol/Toluol und Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden) rechromatographiert. Mit dem Methandurchflußzähler war kein ^{14}C-markiertes Δ^4-Androsten-3,17-dion nachzuweisen. Nach Verschneiden mit inaktiver Referenzsubstanz wurde mit Natriumborhydrid reduziert. Das dabei entstandene Testosteron wurde in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden) chromatographisch gereinigt und anschließend acetyliert. Das Testosteronacetat wurde in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden) chromatographiert, anschließend eluiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Es wurden 390 Impulse/Minute gezählt. Δ^4-Androsten-3,17-dion war damit nachgewiesen.

Die mit Natronlauge abgetrennte Östrogenfraktion wurde im System Formamid/Chloroform chromatographiert. Mit dem Methandurchflußzähler war keine ^{14}C-Aktivität feststellbar. Die Östron-, Östradiol- und Östriolzonen wurden getrennt eluiert, mit den entsprechenden inaktiven Östrogenen verschnitten und einzeln im System Formamid/Benzol rechromatographiert. Nach erneuter Elution wurden die drei Östrogenfraktionen mit Dimethylsulfat methyliert und die Methyläther in Dimethylformamid/Cyclohexan (5 Stunden) chromatographiert. Die drei Östrogenmethyläther wurden eluiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. In keiner der drei Proben war ^{14}C-Aktivität nachweisbar. Wenn die untere Erfassungsgrenze der Flüssigkeitsszintillationsmessung auf die eingesetzten 6 µCi Kohlenstoff-14 bezogen wird, bedeutet dieses Ergebnis, daß weniger als 0.001 ‰ des eingesetzten Δ^5-Pregnen-3β-ol-17-on in Östrogene umgewandelt wurden.

Die restlichen Metaboliten wurden nicht identifiziert. Bei den Metaboliten C, D und E (Abbildung 13) handelt es sich wahrscheinlich um 5β-Pregnan-3α-ol-20-on, 5β-Pregnan-20β-ol-3-on und 5β-Pregnan-3,17-dion, die bereits als Metabolite des Progesteron nachgewiesen wurden (Kapitel 3.3). Die Peaks G und H (Abbildung 13) stimmen in ihren R_f-Werten mit Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on und 5β-Pregnan-3β-ol-20-on überein.

3.5 Versuche mit 6-^{3}H-Δ^4-Androsten-3,17-dion

Bei der Metabolisierung von Progesteron konnten Spuren von Östron nachgewiesen werden. Östradiol und Östriol waren nicht nachzuweisen. Bei der Metabolisierung von Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on konnte keines der drei Östrogene aufgefunden werden. In zwei Zusatzversuchen wurden Δ^4-Androsten-3,17-dion und Testosteron als Substrate eingesetzt. Beide Steroide sind im Biosyntheseweg die unmittelbaren Vorstufen der Östrogene (s. Tabelle 1). Es sollte festgestellt werden, ob und wenn ja, welche Östrogene aus diesen Substraten entstehen.

0.275 µMol 6-^{3}H-Δ^{4}-Androsten-3,17-dion (1 µCi) wurden mit 100 mg Gewebehomogenat eine Stunde inkubiert. Als Cofaktoren wurden 7.5 mg NADP, 21.5 mg Glukose-6-phosphat, 6 mg Nikotinsäureamid und 0.125 µg Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer gelöst, zugegeben.

Die Östrogene wurden mit Natronlauge von den übrigen Steroiden abgetrennt und in Formamid/Chloroform chromatographiert. Die Östron-, Östradiol- und Östriol-zonen wurden getrennt eluiert und in Formamid/Benzol rechromatographiert. Nach erneuter Elution wurden die drei Fraktionen mit den entsprechenden inaktiven Östrogenen verschnitten und mit Dimethylsulfat methyliert. Die Östrogenmethyläther wurden in Dimethylformamid/Cyclohexan (5 Stunden) chromatographiert. Die Messung der ^{3}H-Aktivität auf den Papierstreifen mit dem Methandurchflußzähler ergab keine eindeutigen Peaks.
Die drei Methylätherzonen wurden eluiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Östronmethyläther	225 Impulse/Minute
Östradiolmethyläther	410 Impulse/Minute
Östriolmethyläther	483 Impulse/Minute

Die Bildung von Östron, Östradiol und Östriol aus Δ^{4}-Androsten-3,17-dion war damit nachgewiesen.

Da nach den oben stehenden Ergebnissen weniger als 1 % des eingesetzten 6-^{3}H-Δ^{4}-Androsten-3,17-dion in Östrogene umgewandelt wurden, erschien es interessant zu untersuchen, ob das restliche Δ^{4}-Androsten-3,17-dion unverändert geblieben war oder ob daraus andere Metabolite gebildet worden waren.
Die neutrale Fraktion wurde daher in Keto- und Hydroxysteroide getrennt. Von diesen beiden Fraktionen wurden die 3β-Hydroxysteroide durch Behandlung mit Digitonin abgetrennt.

Die so erhaltenen vier Fraktionen wurden für 15 Stunden in Dimethylformamid/Cyclohexan chromatographiert. Die ^{3}H-Aktivitätsverteilung auf den Papierstreifen wurde gemessen. Dabei zeigte sich, daß in den Fraktionen der 3β-Hydroxysteroide keine ^{3}H-Aktivität nachweisbar war. Die Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Keto- und Hydroxysteroide ist in den Abbildungen 16 und 17 wiedergegeben.

Abb. 16: ^{3}H-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Ketosteroide nach der Chromatographie in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden)

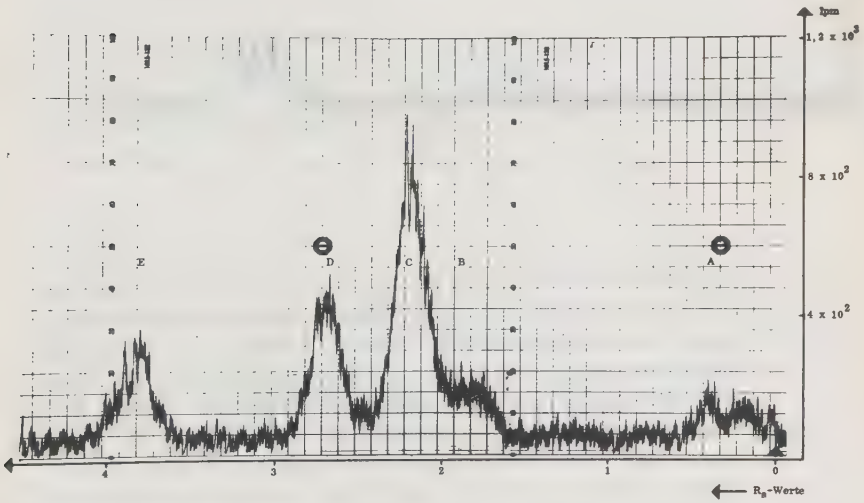
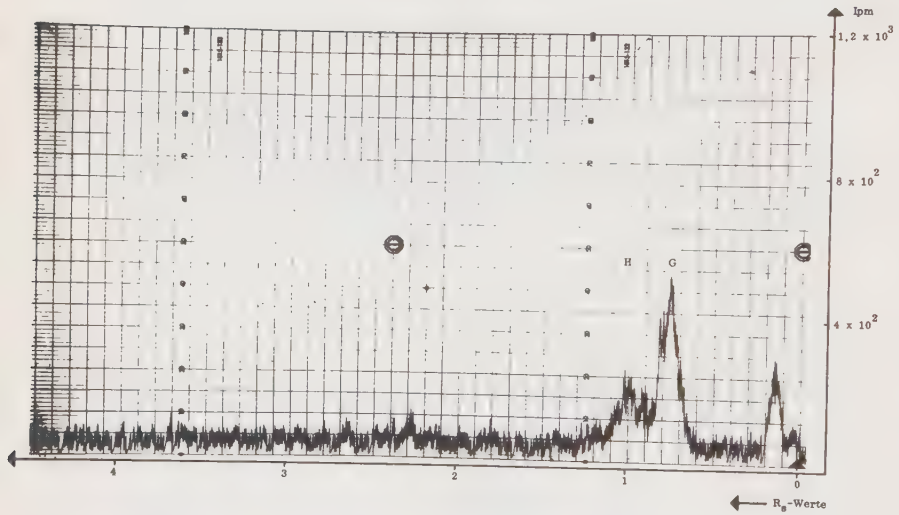


Abb. 17: ^{3}H-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Hydroxysteroide nach der Chromatographie in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden)



Die neutralen Metabolite des Δ^4-Androsten-3,17-dion wurden nicht einzeln identifiziert. Eine Betrachtung des chromatographischen Verhaltens läßt aber auch ohne die Durchführung spezieller Nachweisreaktionen einige Schlüsse auf die Identität der Metabolite zu. So kann mit Sicherheit gesagt werden, daß es sich bei den Metaboliten mit einem R_S-Wert, größer als 2, um Verbindungen mit reduzierter Δ^4-Doppelbindung handelt, denn es sind keine anderen Metabolite des Δ^4-Androsten-3,17-dion (R_S = 1.9) bekannt, die eine geringere Polarität als die Ausgangsverbindung haben.

Der Peak mit dem R_s = 3.8 deckt sich mit 5β- und 5α-Androstan-3,17-dion. Testosteron (R_s = 1) war nicht festzustellen. Das Auftreten von mehreren Hydroxysteroiden (Abbildung 17) beweist zwar, daß die Reduktion der 17-Ketogruppe stattgefunden hat, läßt aber offen, ob das vor oder nach der Reduktion der Δ^4-Doppelbindung geschehen ist.

3.6 Versuche mit 6-^{3}H-Testosteron

0.275 µMol 6-^{3}H-Testosteron (10 µCi) wurden mit 100 mg Gewebehomogenat eine Stunde inkubiert. Als Cofaktoren wurden 7.5 mg NADP, 21.5 mg Glukose-6-phosphat, 6 mg Nikotinsäureamid und 0.125 µg Glukose-6-phosphatdehydrogenase, in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer gelöst, zugegeben.

Die Östrogene wurden wie bei dem Versuch mit Δ^4-Androsten-3,17-dion als Methyläther isoliert. Die Messung der ^{3}H-Aktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler ergab folgende Werte:

Östronmethyläther	748 Impulse/Minute
Östradiolmethyläther	3071 Impulse/Minute
Östriolmethyläther	2154 Impulse/Minute

Die neutralen Steroide wurden in Keto- und Hydroxysteroide getrennt. Beide Fraktionen wurden mit Digitonin behandelt. Nach der Chromatographie für 15 Stunden in Dimethylformamid/Cyclohexan wurde die ^{3}H-Aktivitätsverteilung gemessen. In den 3β-Hydroxysteroidfraktionen war genau wie beim Δ^4-Androsten-3,17-dion keine ^{3}H-Aktivität nachweisbar.

Abb. 18a und b: ^{3}H-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Ketosteroide nach der Chromatographie in Dimethylformamid/ Cyclohexan (15 Stunden)

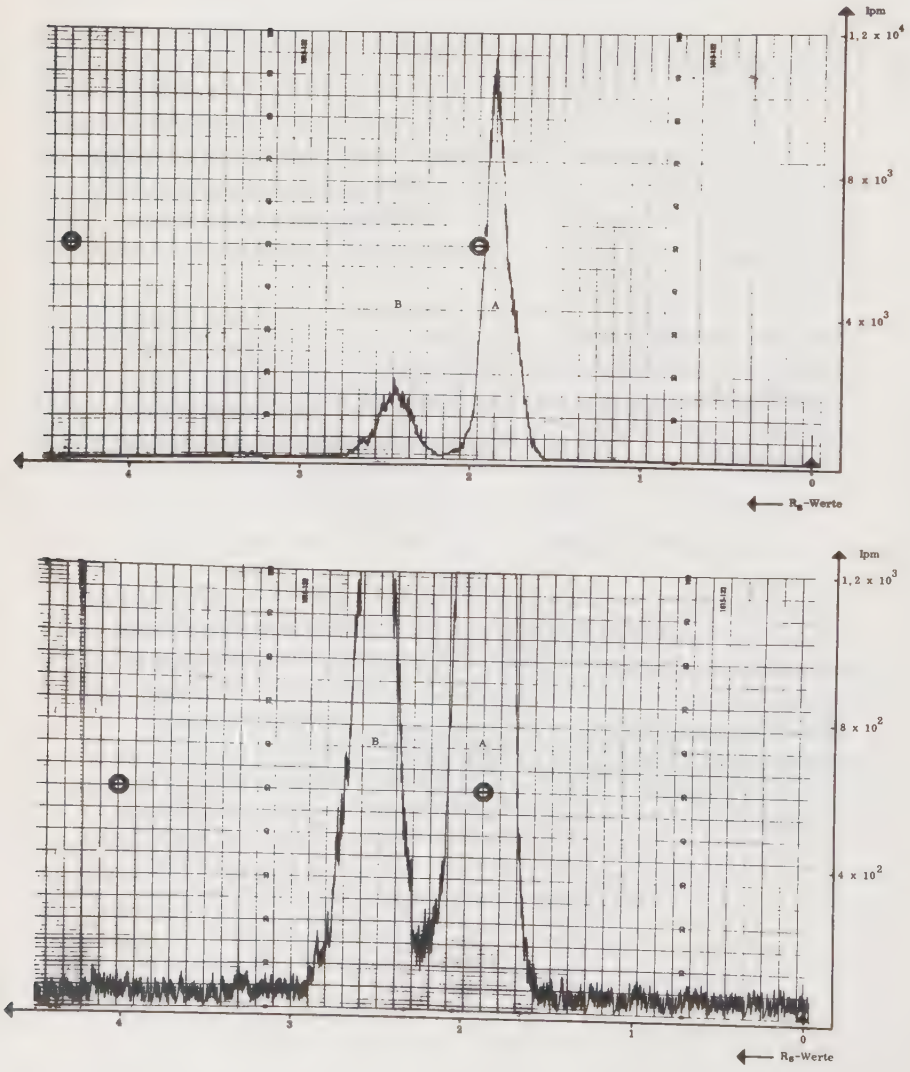
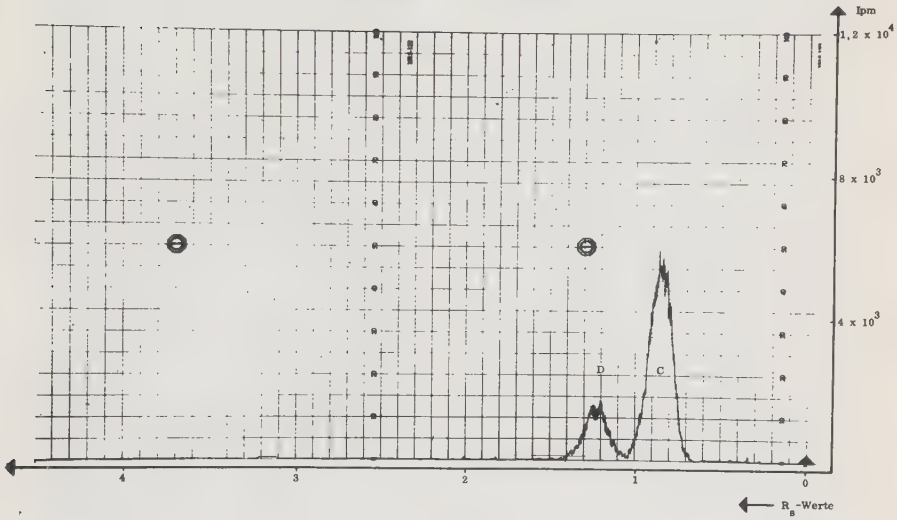


Abb. 19: ^{3}H-Aktivitätsverteilung der mit Digitonin nicht fällbaren Hydroxysteroide nach der Chromatographie in Dimethylformamid/Cyclohexan (15 Stunden)



Die Verteilung der Ketosteroide wurde ein zweites Mal mit einem gegenüber der ersten Messung um den Faktor 10 gedehnten Meßbereich des Schreibers aufgezeichnet (Abbildung 18b). Dabei zeigte sich, daß bei R_S = 1 keine Aktivität feststellbar war. Das ^{3}H-Testosteron ist also praktisch vollständig umgesetzt worden.

Δ^4-Androsten-3,17-dion ist, wenn überhaupt, nur in Spuren entstanden, denn es müßte zwischen den Peaks A und B auftreten (R_S = 1.9). Das wurde durch eine Rechromatographie nach der Zugabe von inaktivem Δ^4-Androsten-3,17-dion bestätigt. Die UV-positive Zone des Δ^4-Androsten-3,17-dion lag zwischen den beiden Peaks.

Das Auftreten von mindestens zwei markierten Hydroxysteroiden (Abbildung 19) beweist, daß eine teilweise Reduktion der 3-Ketogruppe erfolgt ist.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Zwischen- und Endprodukte der Steroidbiosynthese im Säugetierovar(siehe Abbildung 1) wurden auch bei der Inkubation von Steroiden mit Legehuhnovar gebildet. Es kann also angenommen werden, daß die Steroidbiosynthese bei Hühnervögeln und Säugetieren nach dem gleichen Reaktionsschema abläuft.

Neben den Biosyntheseprodukten wurden im Legehuhnovar aber auch zahlreiche Steroide gebildet, die als Abbauprodukte gelten, d.h. sie besitzen keine oder nur geringe hormonale Aktivität und können in vivo auch nicht mehr in hormonal wirksame Stoffe umgewandelt werden. Zu diesen Verbindungen zählen alle Steroide, bei denen die Δ^4-Doppelbindung und die 3-Ketogruppe reduziert worden sind. Von den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Metaboliten gehören 5ß-Pregnan-3,20-dion, 5ß-Pregnan-3α-ol-20-on, 5ß-Pregnan-3ß-ol-20-on, 5ß-Pregnan-20ß-ol-3-on und 5ß-Pregnan-3α,20ß-diol dazu. Nach vierstündiger Inkubation waren mehr als 80 % des eingesetzten Progesteron in Metabolite mit reduzierter Δ^4-Doppelbindung und 76.3 % in Metabolite mit reduzierter 3-Ketogruppe umgewandelt(siehe Tabelle 3). Bei vergleichbaren Untersuchungen mit Säugetierovarien sind keine ähnlichen Ergebnisse erhalten worden. Obwohl bereits darauf hingewiesen wurde, daß quantitative Aussagen bei in vitro Versuchen problematisch sind, kann aus den vorliegenden Ergebnissen gefolgert werden, daß die Aktivität von steroidabbauenden bzw. -inaktivierenden Enzymen im Legehuhnovar größer ist als im Ovar von Säugetieren. Diese Erscheinung stellt möglicherweise ein zusätzliches Regulationsprinzip der Steroidbiosynthese dar, denn die 'Zyklus'-länge des Legehuhns von nur einem Tag stellt hohe Anforderungen an den Regulationsmechanismus. In welcher Weise die Steroidbiosynthese durch den Abbau von Progesteron beeinflußt wird, kann nicht gesagt werden. Die Verarmung an Progesteron als Glied der Biosynthesekette könnte zu einer Verringerung der Biosyntheserate führen. Das Gegenteil könnte aber auch der Fall sein, denn Progesteron hemmt in vitro die Abspaltung der

C_{17}-Seitenkette und damit die Bildung von Δ^4-Androsten-3,17-dion aus Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion(29). Wenn das auch in vivo der Fall ist, würde eine verminderte Progesteronmenge die Steroidbiosyntheserate erhöhen.

In Abbildung 20 ist ein Reaktionsschema für die Biosynthese und den Abbau von Steroiden durch Ovargewebe des Legehuhns aufgestellt. Die vorliegenden Ergebnisse berechtigen zu der Aussage, daß die Biosynthese den gleichen Verlauf wie beim Säugetier nimmt. Einen Hinweis auf die Reihenfolge der Abbaureaktionen gibt die Untersuchung der Metabolisierung von Progesteron in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer(Abbildungen 11a und b s. S. 33). In Übereinstimmung mit der Erfahrung, daß 3α-und 3ß-Hydroxysteroid-dehydrogenasen 3-Ketogruppen erst nach Reduktion der Δ^4-Doppelbindung reduzieren können(1), fällt die Konzentration an 5ß-Pregnan-3,20-dion nach Erreichung eines Maximums wieder ab, während die Konzentration an 5ß-Pregnan-3α-ol-20-on und Pregnan-3α,20ß-diol ständig steigt. Ob der Abfall des Δ^4-Pregnen-20ß-ol-3-on nach zweistündiger Inkubation auf die Reduktion der Δ^4-Doppelbindung oder auf eine 17α-Hydroxylierung zurückzuführen ist, bleibt offen.

In Abbildung 20 sind die Abbaureaktionen der C_{19}-Steroide Δ^4-Androsten-3,17-dion und Testosteron nicht eingetragen, da die einzelnen Reaktionsprodukte nicht identifiziert wurden. Sicher ist aber, daß auch bei C_{19}-Steroiden die 3-und 17-Ketogruppen und die Δ^4-Doppelbindungen teilweise reduziert wurden.

Die Bildung der Nebennierenrindenhormone Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion(DOC) und Corticosteron berechtigt zu der Annahme, daß auch beim Legehuhn die Enzymspektren der verschiedenen endokrinen Organe sehr ähnlich sind. Es bestehen offenbar auch hier nur quantitative Unterschiede.

In Tabelle 4 sind alle steroidspezifischen Enzyme aufgeführt, die durch Identifizierung der entsprechden Reaktionsprodukte im Ovar des Legehuhns nachgewiesen werden konnten. Diese

Abbildung 20: IN VITRO BIOSYNTHESE UND ABBAU VON STEROIDEN IM OVAR DES LEGEHUHNS.

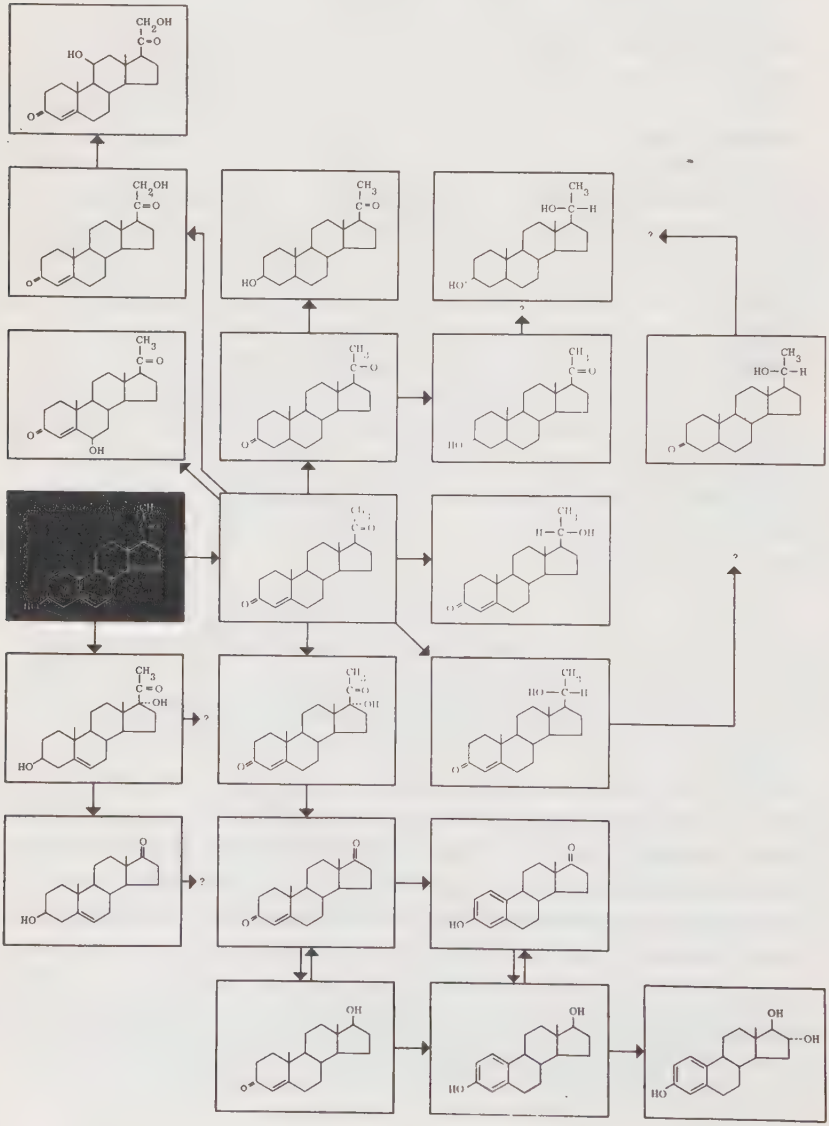


Tabelle 4: Unter in vitro Bedingungen aktive steroidspezifische Enzyme des Legehuhnovars.

Enzyme	Enzymatisch gesteuerte Reaktionsfolge
17α-Hydroxylase	Progesteron → Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion
6β-Hydroxylase	Progesteron → Δ^4-Pregnen-6β-ol-3,20-dion
21-Hydroxylase	Progesteron → Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion
11β-Hydroxylase	Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion → Corticosteron
16α-Hydroxylase	Östradiol → Östriol
17α,20-C_{21}-Desmolase	Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion → Δ^4-Androsten-3,17-dion
10,19-Desmolase	Δ^4-Androsten-3,17-dion → Östron
Δ^4-5β-Reduktase	Progesteron → 5β-Pregnan-3,20-dion
Δ^5-3β-Hydroxysteroid-dehydrogenase + Steroidisomerase	Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on → Progesteron
3β-Hydroxysteroid-dehydrogenase	5β-Pregnan-3,20-dion → 5β-Pregnan-3β-ol-20-on
3α-Hydroxysteroid-dehydrogenase	5β-Pregnan-3,20-dion → 5β-Pregnan-3α-ol-20-on
20β-Hydroxysteroid-dehydrogenase	Progesteron → Δ^4-Pregnen-20β-ol-3-on
20α-Hydroxysteroid-dehydrogenase	Progesteron → Δ^4Pregnen-20α-ol-3-on
17β-Hydroxysteroid-dehydrogenase	Δ^4-Androsten-3,17-dion → Testosteron

Aufstellung kann natürlich keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben, da 1. nicht alle Reaktionsprodukte identifiziert wurden und 2. nicht sicher gestellt ist, daß unter den gegebenen experimentellen Bedingungen alle Enzyme wirksam waren.

5. Zusammenfassung

Es wurde untersucht, welche Zwischen- und Endprodukte bei der Metabolisierung von radioaktiv markierten Steroidhormonen durch Gewebehomogenat des Legehuhnovars in vitro entstehen. Als Steroide wurden 4-^{14}C-Progesteron, 4-^{14}C-Δ^5-Pregnen-3ß-ol-20-on, 6-^{3}H-Δ^4-Androsten-3,17-dion und 6-^{3}H-Testosteron eingesetzt.

Bei der Verwendung von Progesteron als Substrat konnten folgende Metabolite nachgewiesen werden: Δ^4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion, Δ^4-Androsten-3,17-dion, Testosteron, Östron, Δ^4-Pregnen-20ß-ol-3-on, Δ^4-Pregnen-20α-ol-3-on, 5ß-Pregnan-3,20-dion, 5ß-Pregnan-3ß-ol-20-on, 5ß-Pregnan-3α-ol-20-on, 5ß-Pregnan-20ß-ol-3-on, 5ß-Pregnan-3α,20ß-diol, Δ^4-Pregnen-6ß-ol-3,20-dion, Δ^4-Pregnen-21-ol-3,20-dion(Desoxycorticosteron) und Corticosteron. Östriol, Östradiol und Steroidkonjugate konnten nicht nachgewiesen werden. Mit Gewebeschnitten wurde, bei verringertem Progesteronumsatz, das gleiche Metabolitenspektrum erhalten.

Als Metabolite des Δ^5-Pregnen-3ß-ol-20-on wurden Δ^5-Pregnen-3ß,17α-diol-20-on, Δ^5-Androsten-3ß-ol-17-on, Δ^4-Androsten-3,17-dion und Progesteron identifiziert. Östrogene und Steroidkonjugate konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei den Versuchen mit Δ^4-Androsten-3,17-dion und Testosteron wurden Östron, Östradiol und Östriol nachgewiesen. Außerdem konnte eine teilweise Reduktion der Δ^4-Doppelbindung und der 3- und 17-Ketogruppen festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, daß die Biosynthese von Steroidhormonen im Ovar des Legehuhns den gleichen Verlauf nimmt wie im Säugetierovar. Die Aktivität von steroidabbauenden Enzymen scheint im Legehuhnovar größer zu sein als im Säugetierovar.

Die Ergebnisse wurden in einem Stoffwechselschema zusammengefaßt. Die durch Identifizierung der entsprechenden Reaktionsprodukte nachgewiesenen steroidspezifischen Enzyme des Lege-

huhnovars wurden in einer tabellarischen Übersicht zusammengestellt.

Literaturhinweise

(1) Dorfmann, R.I. Ungar, F. — Metabolism of Steroid Hormones. Academic Press, New York 1965

(2) Sachs, L. — Haupttendenzen und Regulationsprinzipien der Steroidhormon-Biogenese. Arzneimittelforsch. 12 (1962) 244

(3) Dominguez, O.V. Acevedo, H.F. Huseby, R.A. Samuels, L.T. — Steroid 21-Hydroxylase in Normal Testes and Malignant Interstitial Cell Tumors. J. Biol. Chem. 235 (1960) 2608

(4) Vinson, G.P. — Steroid Production in vitro by the Ovaries and Adrenal Glands of the Thirteenlined Ground Squirrel. J. Endocrinol. 32 (1965) 401

(5) Mitchell, J.E. Hobkirk, R. — Conversion of 16-^{14}C-Estradiol-17β to ^{14}C-labelled Estriol by Avian Liver Slices. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1 (1959) 72

(6) Ainsworth, L. Common, R.H. — Urinary and Fecal Conversion Products of 16-Oxoestradiol-17β-16-^{14}C in the Domestic Fowl. Can. J. Biochem. Physiol. 41 (1964) 2045

(7) Ainsworth, L. Carter, A.L. Common, R.H. — Urinary Conversion Products of 16-Epiestriol-16-^{14}C in the Domestic Fowl. Can. J. Biochem. Physiol. 42 (1964)521

(8) Ozon, R. Breuer, H. — Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. Z. Physiol. Chem. 341 (1965) 239

(9) de Roos, R. — In vitro Production of Corticosteroids by Chicken Adrenals. Endocrinology 67 (1960) 719

(10) de Roos, R.
de Roos, C.C.
Angiotensin II: Its Effects on Corticoid Production by Chicken Adrenals in vitro.
Science 141 (1963) 1284

(11) Sandor, T.
Lamoureux, J.
Lanthier, A.
Adrenal Cortical Function in Birds.
Steroids 6 (1965) 143

(12) Fevold, H.R.
Eik-Nes, K.B.
Progesterone Metabolism by Testicular Tissue of the English Sparrow (Passer domesticus).
Gen. Comp. Endocrinol. 3 (1963) 335

(13) Fevold, H.R.
Eik-Nes, K.B.
Progesterone Metabolism by Testicular Tissue of the English Sparrow (Passer domesticus) during the Annual Reproductive Cycle.
Gen. Comp. Endocrinol. 2 (1962) 506

(14) Layne, D.S.
Common, R.H.
Maw, W.A.
Fraps, R.M.
Presence of Progesterone in Extracts of Ovaries of Laying Hens.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94 (1957) 528

(15) Layne, D.S.
Common, R.H.
Maw, W.A.
Fraps, R.M.
Presence of Estrone, Estradiol and Estriol in Extracts of Ovaries of Laying Hens.
Nature 181 (1958) 351

(16) Chieffi, G.
Botte, V.
The Distribution of some Enzymes involved in the Steroidogenesis of Hen's Ovary.
Experientia 21 (1965) 16

(17) Zaffaroni, A.
Burton, R.B.
Keutmann, E.H.
Adrenal Cortical Hormones: Analysis by Paper Partition Chromatography and Occurence in the Urine of Normal Persons.
Science 111 (1950) 6

(18) Bush, I.E.
Methods of Paper Chromatography of Steroids Applicable to the Study of Steroids in Mammalian Blood and Tissue.
Biochem. J. 50 (1952) 370

(19) Axelrod, L.R.
The Separation and Identification of Mixtures of C_{21}- and C_{19}-Steroids by Paper Chromatography.
J. Biol. Chem. 205 (1953) 173

(20) Lewbart, M.L.
Schneider, J.J.
Paper Chromatography of Steroid Glucuronosides and Sulphates.
Nature 176 (1955) 1175

(21) Oertel, G.W.
Östrogenbestimmungen. I.Bestimmung von Gesamtöstrogenen im Plasma.
Clin. Chim. Acta 6 (1961) 237

(22) Ismail, A.A.A.
Harkness, R.A.
A Method for the Estimation of Urinary Testosterone.
Biochem. J. 99 (1966) 717

(23) Zimmermann, [illegible]
Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten.
Springer- Verlag, 1955, S. 20

(24) Brown, J.B.
A Chemical Method for the Determination of Estriol, Estron and Estradiol in Human Urine.
Biochem. J. 60 (1955) 185

(25) Menini, C.
Norymberski, J.K.
The Oxidation of Steroids with tert. Butylchromate.
Biochem. J. 84 (1962) 195

(26) Hübener, H.J.
Staib, [illegible]
Biochemie der Nebennierenrindenhormone.
G.Thieme Verlag, Stuttgart 1965, S.214

(27) Norymberski, J.K.
Woods, G.F.
Partial Reduction of Steroid Hormones and Related Substences.
J. Chem. Soc. (1955) 3426

(28) Hübener, H.J.
Staib, W.H.
Biochemie der Nebennierenrinden-Hormone.
G.Thieme Verlag, Stuttgart 1963, S.183

(29) Mahajan, D.K.
Samuels, L.T.
Inhibition of Steroid 17-Desmolase by Progesterone.
Fed. Proc. 21 (1962) 209

L e b e n s l a u f

Am 30.9.1937 wurde ich als Sohn des Kreisoberinspektors Johannes Anders in Trachenberg/Schlesien geboren. In Grimma/Sachsen besuchte ich die Grund- und Oberschule und legte im Juli 1955 die Reifeprüfung ab. An der Fichtenberg-Schule in Berlin-Steglitz bestand ich im September 1956 die Anerkennungsprüfung des Reifezeugnisses der sowjetischen Besatzungszone. Im Wintersemester 1956 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin. Im Mai 1961 bestand ich die Diplom-Vorprüfung und im Juli 1963 die Diplom-Hauptprüfung. Im Hahn-Meitner-Institut für Kernforschung in Berlin-Wannsee fertigte ich unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. K.E. Zimen meine Diplomarbeit an. Mit der Abgabe der Diplomarbeit im Januar 1965 beendete ich das Studium. Anschließend wurde ich von Herrn Professor Dr. K. Bronsch als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Tierzucht und Tierernährung der Freien Universität Berlin angestellt und begann unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. R. Riemschneider mit der Abfassung der vorliegenden Dissertation.